

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ENGENHARIA**

**CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**SAMARA NUNES CAMPOS VICENTINI**

**BIOPROSPECÇÃO E FILOGENIA DE BACTÉRIAS FLUORESCENTES DO  
GÊNERO *Pseudomonas* COMO POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE DA  
QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA**

Ilha Solteira  
2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – SISTEMAS DE  
PRODUÇÃO**

**SAMARA NUNES CAMPOS VICENTINI**

**BIOPROSPECÇÃO E FILOGENIA DE BACTÉRIAS FLUORESCENTES DO  
GÊNERO *Pseudomonas* COMO POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE DA  
QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP – Campus de Ilha Solteira, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Nome do orientador  
**Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini**

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

V633b      Vicentini, Samara Nunes Campos.  
Bioprospecção e filogenia de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* como potenciais agentes de biocontrole da queima-das-folhas em braquiária / Samara Nunes Campos Vicentini. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2018  
42 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2018

Orientador: Paulo Cezar Ceresini  
Inclui bibliografia

1. Manejo integrado. 2. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 3. Morte súbita. 4. Controle biológico. 5. Análises filogenéticas.

  
Raiane da Silva Santos

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bioprospecção e filogenia de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* como potenciais agentes de biocontrole da queima-das-folhas em braquiária

AUTORA: SAMARA NUNES CAMPOS VICENTINI

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA, área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. GISELLE DE CARVALHO

Departamento Regional do Mato Grosso do Sul / Instituto SENAI de Inovação Biomassa



Dr. MARCO ANTONIO BASSETO

Escritório de Defesa Agropecuária de Araçatuba / Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo

Ilha Solteira, 21 de agosto de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por toda luz que sempre me enviou para que eu pudesse trilhar todos os caminhos que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu marido Alan Henrique Vicentini, pelo apoio, confiança e amor que transbordam em nosso relacionamento e foram essenciais em todas as etapas de minha vida.

Aos meus pais, José do Carmo e Maria Luzinete, que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas, pelas orações dedicadas a mim e pelo exemplo de caráter e bondade que me deram ao longo desses anos que me fizeram ser quem sou hoje.

Aos meus irmãos, Alan, Maraisa e Carlos, pelo apoio e incentivo que de alguma forma me ajudaram a enfrentar todos os desafios em minha formação.

Aos meus sobrinhos Maria Eduarda, Igor e à pequena Livia que está á caminho, por me fazerem viver os melhores momentos e relembrar a minha infância.

Aos meus sogros, Claudete e Moacir, por todos os conselhos e ajuda durante esse tempo.

Às minhas cunhadas Suelen, Jaqueline, Bárbara e Mariana e aos meus cunhados Rafael e Márcio, pela troca de palavras de amizade e experiências ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, por todo apoio, confiança, compreensão, paciência e conhecimento transmitido ao longo desses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n°: 2017/03403-0 pelo apoio financeiro e concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Aos amigos do grupo do Laboratório de Fitopatologia, em especial Loane e Tiago que fizeram com que tudo isso fosse possível e tiveram participação essencial no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Giselle, Diego, Anne, Emanoele, Regiane e Juliana pela amizade, companheirismo e por toda ajuda dedicada ao longo desses anos.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Você pode dizer que eu sou um sonhador, mas eu não sou o único. Tenho a esperança de que um dia você se juntará a nós, e o mundo será como um só.

## RESUMO

O controle biológico é um dos métodos do manejo integrado de doenças de plantas, sendo uma das únicas alternativas viáveis para minimizar o impacto da queima-das-folhas e morte súbita das pastagens do gênero *Urochloa* (anteriormente *Brachiaria*). A queima-das-folhas e morte de pastagens é causada pelo fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG-1 IA. Em nosso estudo determinamos se isolados de espécies de *Pseudomonas* fluorescentes obtidos de solos supressivos do bioma Amazônico possuem potencial como agentes de biocontrole de *R. solani* AG-1 IA. Especificamente objetivamos: i. Efetuar o *screening* de isolados de *Pseudomonas* quanto ao potencial de biocontrole *in vitro*; ii. Realizar a identificação molecular dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes selecionados como potenciais agentes de biocontrole e iii. Determinar se as bactérias selecionadas *in vitro* mantêm, *in vivo*, o potencial de biocontrole da queima-das-folhas e morte da braquiária. Três isolados foram selecionados como potenciais agentes biocontroladores nos testes de antagonismo *in vitro* (Amana, Poti e Yara), pois diminuíram significativamente tanto o crescimento micelial quanto a germinação de escleródios do patógeno. Com base em análises filogenéticas, os isolados Amana e Yara foram agrupados ao clado de *Pseudomonas putida* enquanto o isolado Poti foi agrupado em clado distinto de todos os demais, e possivelmente se constitui numa nova espécie. Nos testes *in vivo*, a inoculação via sementes não resultou em controle de *R. solani* AG-1 IA. Já na aplicação foliar do agente de biocontrole, o isolado Amana foi mais eficaz no controle do fitopatógeno.

**Palavras-chave:** Manejo integrado. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Morte súbita. Controle biológico. Análises filogenéticas.



## ABSTRACT

Biological control is one of the methods of the integrated management of plant diseases, which is one of the only viable alternative to minimize foliar blight impact and sudden death of pastures from genus *Urochloa* (previously known as *Brachiaria*). Foliar blight and death of pastures are caused by the fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. In our study, it was determined whether isolates from fluorescent *Pseudomonas* obtained from suppressive soils on the Amazon biome had potential as biocontrol agents of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Specifically, we aim to: i. Carry out a screening of isolates from *Pseudomonas* to evaluate their potential as *in vitro* biocontroller; ii. Perform molecular identification of selected fluorescent *Pseudomonas* isolates as potential biocontrol agents; and iii. Determine whether *in vitro* selected bacterial strains maintain the biocontrol ability *in vivo* of foliar blight and sudden death of braquiária. Three isolates were selected as potential biocontroller agents *in vitro* antagonism tests (Amana, Poti e Yara), which reduced significantly mycelial growth and sclerotia germination of pathogen. Based on phylogenetic analyzes, Amana and Yara isolates were grouped to the clade belonging to *Pseudomonas putida* and Poti isolated was grouped in a distinct clade, and should to constitute a new species. For *in vivo* tests, seed inoculation did not result in *R. solani* AG-1 IA control. On the other hand, in foliar application of biocontrol agent, Amana isolated was the most efficient phytopathogen controller.

**Keywords:** Integrated management. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Sudden death. Biological control. Phylogenetic analyzes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA pela atividade antifúngica de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. ....25
- Figura 2** – Teste de antagonismo em placas de Petri, (A) Isolados de *Pseudomonas* spp. inibindo o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e (B) refere-se ao tratamento controle apenas com o patógeno. ....26
- Figura 3** – Inibição da germinação de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, sendo (A) escleródios do isolado MTUB01C, (B) MTUB04E e (C) MTUB05A, inoculados com o isolado bacteriano Yara (D), (E) e (F) representam os tratamentos controle, que foi inoculado apenas escleródios do patógeno. ....27
- Figura 4** – Árvore filogenética baseada em sequências dos genes 16S e *rpoB* de espécies selecionadas do gênero *Pseudomonas* representando vários grupos filogenéticos dentro deste gênero. ....29
- Figura 5** – Valores de área infectada com sintomas *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em plantas de braquiária cv. Marandu submetidas à aplicação dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp. fluorescentes via semente. ....31
- Figura 6** – Sintomas em plantas de braquiária cv. Marandu com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (A) com inoculação via semente do isolado de *Pseudomonas* fluorescentes Amana, e (B) apenas com a inoculação do patógeno; (C) e (D) representam os controles apenas com a aplicação do isolado bacteriano e sem inoculação, respectivamente. ....32
- Figura 7** – Valores de área infectada com sintomas *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em plantas de braquiária cv Marandu submetidas à aplicação foliar dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes. ....33
- Figura 8** – Sintomas em plantas de braquiária cv. Marandu com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (A) com inoculação foliar do isolado de *Pseudomonas* fluorescentes Amana, e (B) apenas com a inoculação do patógeno; (C) e (D) representam os controles apenas com a aplicação do isolado bacteriano e sem inoculação, respectivamente. ....34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Sequências dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas na amplificação das reações de PCR de fragmentos dos genes 16S rDNA e *rpoB*.....20
- Tabela 2** – Efeitos sobre a inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por isolados de *Pseudomonas* fluorescentes. ....24
- Tabela 3** – Inibição da germinação de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por atividade antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. ....27
- Tabela 4** – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos de sementes com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes para o controle das lesões causadas por uma mistura de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. ....30
- Tabela 5** – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos submetidos à aplicação foliar de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes para o controle das lesões causadas por uma mistura de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. ....33

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 11 |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 13 |
| 2.1 CONTROLE BIOLÓGICO .....   | 13 |
| 2.2 <i>Pseudomonas</i> FLUORESCENTES COMO AGENTES DE BIOCONTROLE... 13   |    |
| 2.3 <i>Rhizoctonia solani</i> AG1 -1A .....  | 14 |
| 2.4 BRAQUIÁRIA ( <i>Urochloa brizantha</i> ).....  | 14 |
| 2.5 QUEIMA-DAS-FOLHAS E MORTE SÚBITA EM BRAQUIÁRIA. ....   | 15 |
| 2.6 CONTROLE DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA.....   | 15 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 16 |
| 3.1 AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE POPULAÇÃO DO PATÓGENO <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.....   | 16 |
| 3.2 AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. FLUORESCENTES OBTIDAS DE AMOSTRAS DE SOLOS .....   | 16 |
| 3.3 <i>Screening</i> DE ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> FLUORESCENTES QUANTO AO POTENCIAL DE BIOCONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA .....                                   | 17 |
| 3.3.1 Antagonismo de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre o crescimento micelial do patógeno .....  | 17 |
| 3.3.2 Atividade antagonista de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre a germinação de escleródios de <i>R. solani</i> AG1-IA.....   | 18 |
| 3.4 ANÁLISES MOLECULARES .....   | 18 |
| 3.4.1 Extração de DNA.....   | 18 |
| 3.4.2 Reações de PCR e sequenciamento dos genes 16S rDNA e <i>rpoB</i> .....   | 19 |
| 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. FLUORESCENTES NO BIOCONTROLE <i>in vivo</i> DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA CAUSADAS POR <i>Rhizoctonia solani</i> AG1 IA. .... | 21 |
| 3.5.1 Tratamento de sementes com isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes .....  | 21 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.5.2 | Aplicação foliar de isolados de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....   | 22 |
| 4     | <b>RESULTADOS</b> .....   | 24 |
| 4.1   | POTENCIAL DE BIOCONTROLE <i>in vitro</i> DE <i>Pseudomonas</i> spp. SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE <i>R. solani</i> AG-1 IA..... | 24 |
| 4.2   | IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes.....  | 28 |
| 4.3   | POTENCIAL DE ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. FLUORESCENTES NO BIOCONTROLE <i>in vivo</i> DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA. ....                         | 30 |
| 4.3.1 | Tratamento de sementes com isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes .....  | 30 |
| 4.3.2 | Aplicação foliar de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes.....  | 32 |
| 3     |   |    |
| 5     | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 35 |
| 6     | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 38 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 39 |

## 1 INTRODUÇÃO

O manejo químico com fungicidas é amplamente utilizado como uma das estratégias dentro do manejo integrado de doenças de plantas, devido à alegada previsibilidade de seus efeitos, além de supostamente não requerer compreensão mais detalhada de componentes mais complexos do agroecossistema (ATKINSON; MCKINLAY, 1997). O uso intensivo e generalizado de fungicidas modernos sistêmico-curativos altamente específicos representa enorme pressão de seleção sobre as populações de fitopatógenos para resistência a essas moléculas, resultando em insucesso no manejo de doenças foliares importantes (LUCAS et al., 2015).

Uma das estratégias recomendadas no manejo integrado de doenças de plantas e que pode diminuir o impacto ecológico-ambiental do uso de fungicidas na agricultura é o controle biológico (BETTIOL; MORANDI, 2009). O controle biológico prevê o uso de microrganismos que atuam como antagonistas de fitopatógenos e é uma saída ecologicamente sustentável dentro do manejo de doenças de plantas, especialmente em culturas que ocupam grande extensão de áreas no país, como as gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* (anteriormente *Brachiaria*), e para as quais o controle químico com fungicidas é inviável (SOUZA, 2001).

Nesse contexto, o grupo de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, compreende um táxon de microrganismos com metabolismo muito versátil, que pode utilizar compostos orgânicos simples ou complexos, o que confere a estas bactérias alta habilidade para adaptação a vários agroecossistemas (ZAGO et al., 2000).

De fato, a maioria das espécies de *Pseudomonas* que apresentam a capacidade de atuar no biocontrole de fitopatógenos pertence ao grupo fluorescente, tendo destaque às espécies *P. fluorescens* e *P. putida* (KLOEPPER et al., 1980; FERREIRA et al., 2009). O que confere a fluorescência às bactérias é um sideróforo denominado pioverdina, produzido em condições de deficiência de ferro (STANIER et al., 1966).

O fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA apresenta uma ampla gama de hospedeiros, encontrado em diversos agroecossistemas ao redor do mundo e é o agente causal de várias doenças de culturas de grande importância econômica (PERDOMO et al., 2007) como arroz (COSTA-SOUZA et al., 2007), braquiária (RAMOS-MOLINA et al., 2016) e soja (MEYER; SOUZA, 2004). No Brasil, foi

descrito como um importante patógeno de pastagens de braquiária, atacando principalmente *U. brizantha* cv. Marandu na região Amazônica, abrangendo os Estados do Acre, Maranhão, norte do Mato Grosso, Rondônia, sul do Pará e Tocantins (VERZIGNASSI; FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007).

Tendo constatado que *R. solani* AG-1 IA predominou como patógeno associado à braquiária na Amazônia brasileira, especialmente em Rondônia, o objetivo geral deste estudo foi avaliar se bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* obtidas de solos do Bioma Amazônia em Mato Grosso e em Rondônia possuem capacidade de controlar *Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG-1 IA, agente causal da queima-das-folhas e morte súbita em braquiária.

Especificamente, objetivamos:

- i. Efetuar o *screening* de isolados do gênero *Pseudomonas* quanto ao potencial como agente de biocontrole de *R. solani* AG-1 IA *in vitro*.
- ii Realizar a identificação molecular dos isolados selecionados como potenciais agentes de biocontrole.
- iii. Determinar se as bactérias selecionadas *in vitro* mantém, *in vivo*, o potencial de agente de biocontrole da queima-das-folhas e morte súbita em braquiária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é um método que vem sendo cada vez mais utilizado como forma de reduzir o uso de produtos químicos na agricultura, sendo uma das estratégias alternativas recomendadas para o manejo integrado de doenças de plantas, que pode diminuir o impacto ecológico-ambiental na agricultura causado pelo uso intensivo de fungicidas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Os microrganismos antagonistas utilizados no controle de fitopatógenos podem apresentar diversos mecanismos de ação como, por exemplo, a competição por nutrientes e espaço físico, a habilidade de produzir ou resistir a metabólitos que podem impedir a germinação de esporos, provocar a morte de células (por antibiose) e promover a modificação da rizosfera (BETÍNEZ et al., 2004).

Em contraste com outras estratégias de manejo de doenças, o biocontrole visa à interferência de alguns fatores que ocasionam contribuição para restaurar o equilíbrio entre as populações de fitopatógenos e antagonistas de forma preventiva resultando na supressão da ocorrência de doenças, e não à erradicação total do inóculo dos fitopatógenos no campo (BERNARDES, 2006).

### 2.2 *Pseudomonas* FLUORESCENTES COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

O gênero *Pseudomonas* compreende bactérias gram-negativas e aeróbias presentes em praticamente todos os solos agrícolas (WELLER, 2007).

Algumas bactérias pertencentes ao grupo fluorescente que apresentam várias características que as tornam potenciais agentes no controle de alguns patógenos de grande importância agrícola como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (MELO et al., 1998; BAUTISTA et al., 2007).

A ação antagonista do grupo fluorescente resultante da produção de sideróforos (que privam de ferro potenciais fitopatógenos), de diversos outros metabólitos secundários como o ácido cianídrico e de antibióticos não são os únicos mecanismos para explicar o biocontrole de doenças de plantas. De fato, tais bactérias possuem, também, a capacidade de induzir resistência sistêmica que



garante a redução dos sintomas de doenças pela diminuição da colonização do patógeno devido à ativação dos sistemas de defesa na planta (KLOEPPER et al., 1980; BENHAMOU et al., 1996; CHEN et al., 2000). Tais características fazem com que o gênero estudado seja considerado promissor no controle biológico de doenças de plantas economicamente importantes (O'SULLIVAN; O'GARA, 1992).

### 2.3 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

Dentro do complexo de espécies de *R. solani*, destaca-se o grupo de anastomose 1 (AG-1) por agrupar patógenos que afetam uma ampla gama de culturas hospedeiras de importância mundial (PERDOMO et al., 2007). O complexo causa doenças extremamente importantes em plantas poáceas, como a queima da bainha no arroz (BOLKAN; RIBEIRO, 1985; CEDEÑO et al., 1996; COSTA-SOUZA et al., 2007), folha bandeada e queima da bainha no milho (CARDONA et al., 1999; PERDOMO et al., 2007).

Em 1999, o fungo foi descrito como patógeno de braquiária e tem sido relatado como um patógeno importante de forrageiras atacando especificamente *U. brizantha* cv. Marandu nos estados do Acre, Maranhão, norte do Mato Grosso, Rondônia, sul do Pará e Tocantins, todos na região Amazônica (CARDONA et al., 1999; VERZIGNASSI; FERNANDES, 2001; DUARTE et al., 2007).

### 2.4 BRAQUIÁRIA (*Urochloa brizantha*)

No Brasil, a área total de pastagens naturais e plantadas compreende o equivalente a 172,3 milhões de hectares, sendo divulgado nas preliminares do último censo Agropecuário 2017 um aumento de 33,2 % na área de pastagens plantadas no país (IBGE, 2006/2017).

O gênero *Urochloa* é o mais cultivado no Brasil por apresentar características favoráveis como elevada produção de matéria seca, boa adaptabilidade, grande facilidade de estabelecimento no campo e durante a maior parte do ano apresenta um satisfatório crescimento (CRISPIM; BRANCO, 2002).

Tais fatores fizeram com que aumentasse a popularidade e ótima aceitação entre os pecuaristas da espécie *U. brizantha*, destacando-se o cv. Marandu, desde o seu lançamento em 1983, o que resultou no estabelecimento de extensas áreas de

plântio dessa forrageira, tornando o sistema de monocultivo vulnerável a diversos estresses abióticos e bióticos (MARCHI et al., 2011)

## 2.5 QUEIMA-DAS-FOLHAS E MORTE SÚBITA EM BRAQUIÁRIA

A morte de pastagens de capim braquiária na América do Sul, foi associada ao fungo *R. solani* AG-1, no início dos anos 90. O fungo emergiu pela primeira vez na Colômbia, em áreas de cultivo de arroz, que devido à crescente demanda por pecuária extensiva foi substituído pelo cultivo de braquiária (LEE; RUSH, 1983; HASHIBA e KOBAYASHI, 1996).

Desde os primeiros relatos de ocorrência da doença, a queima-das-folhas e morte súbita atingiu uma considerável e ampla distribuição na região Norte do Brasil, que por consequência ocasionou perdas elevadas à produção brasileira de pastagens (ARGEL et al., 2005; DUARTE et al., 2007).

## 2.6 CONTROLE DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA

De acordo com o observado até o presente, algumas medidas podem ser tomadas para minimizar os problemas decorrentes da doença, como a diversificação de cultivares de espécies forrageiras e a escolha da área para reforma dos pastos evitando áreas com excesso de focos da doença (MARCHI et al., 2011).

Porém, o uso de outras estratégias de manejo dessa doença que sejam economicamente viáveis, ecologicamente sustentáveis e minimamente eficazes, são inexistentes fazendo com que o controle biológico se apresente como uma boa alternativa para o manejo da queima e morte de pastagens em braquiária.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE POPULAÇÃO DO PATÓGENO *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

Os isolados utilizados no presente estudo foram amostrados em junho de 2016 em pastagens de braquiária atacadas pela morte súbita no município de Paranaíta, na região de Alta Floresta, Mato Grosso. Foram obtidas 45 amostras de plantas infectadas em focos da doença, o que resultou no mesmo número de isolados de *R. solani* AG-1 IA. O isolamento foi efetuado em meio seletivo Ko e Hora (KO; HORA, 1971) e a purificação das culturas por transferência para meio BDA (batata-dextrose-ágar).

Os isolados formaram escleródios tipo “sasaki”, característicos do grupo de anastomose AG-1 IA (CHAVARRO MESA et al., 2015; RAMOS-MOLINA et al., 2016). Para preservação de culturas por longo prazo, os escleródios obtidos de culturas crescidas em meio BDA, por dez dias a 28°C, foram transferidos para tubos criogênicos de 2 mL contendo sílica gel esterilizada. Preservou-se, também, hifas crescidas em grãos de arroz parboilizados e esterilizados adicionados ao topo das culturas do patógeno por 5 dias. Dos 45 isolados de *R. solani* AG-1 IA obtidos, foram utilizados três isolados para o presente estudo: MTUB01C, MTUB05A e MTUB04E, que foram selecionados com base em resultados de testes de agressividade realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

#### 3.2 AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTES OBTIDAS DE AMOSTRAS DE SOLOS

Os isolados de espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram obtidos por amostragem de solos não perturbados e potencialmente supressivos do Bioma Floresta Amazônica no norte do Mato Grosso, na bacia do Rio Teles Pires, no município de Paranaíta (25 pontos) e em Rondônia, no município de Colorado do Oeste (12 pontos), no ano de 2016. As coletas foram realizadas na profundidade de 0 – 0,10 m, com presença de material orgânico. O isolamento foi realizado depositando 100 µL da suspensão  $10^{-6}$  ufc.mL<sup>-1</sup> em placas de Petri contendo o meio seletivo S2 (GOULD et al., 1984), e incubou-se por 48 horas a 23°C. A seleção deu-

se pela fluorescência das colônias sob luz ultravioleta a 310 nm, além dos halos de coloração esverdeada em volta da colônia no meio de cultura. As colônias fluorescentes com essas características foram consideradas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. A preservação a longo prazo foi realizada em tubos criogênicos de 2 mL onde culturas das bactérias foram liofilizadas por 24 horas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , além da manutenção em solução salina (NaCl 0,85%) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes oriundos dos solos de Mato Grosso (57) e das amostras de Rondônia (66), totalizaram 123 isolados.

### 3.3 Screening DE ISOLADOS DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES QUANTO AO POTENCIAL DE BIOCONTROLE *in vitro* DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

#### 3.3.1 Antagonismo de *Pseudomonas* spp. sobre o crescimento micelial do patógeno

O antagonismo de *Pseudomonas* sobre o crescimento micelial de *R. solani* AG-1 IA foi determinado transferindo-se um disco de 7 mm de diâmetro de meio de cultura contendo hifas com sete dias de crescimento de cada um dos três isolados do patógeno em meio BDA a  $28^{\circ}\text{C}$ , para o centro de placas de Petri com meio King's B (KB). Logo após alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foram depositadas próximo à borda da placa, em quatro pontos equidistantes, tendo ao centro o patógeno. As placas foram mantidas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

As alíquotas de cada um dos 123 isolados foram obtidas cultivando-se por 14 horas em meio líquido Lúria-Bertani (LB) a  $28^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 190 rpm, ajustada a concentração para  $6,2 \times 10^8 \text{ ufc.mL}^{-1}$  ( $\text{DO}_{620}=0,8$ ). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Para avaliação as placas foram fotografadas usando câmera digital acoplada a um monopé a 20 cm de altura, onde a área total de inibição do crescimento micelial do patógeno foi determinada com auxílio do programa de análise de imagens Assess da APS (ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification; Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI, 2008).

### 3.3.2 Atividade antagonista de *Pseudomonas* spp. sobre a germinação de escleródios de *R. solani* AG1-IA

Escleródios jovens obtidos de culturas de cada um dos três isolados testados de *R. solani* AG-1 IA cultivadas em meio BDA por sete dias a 28°C, foram transferidos para erlenmeyers contendo 20 mL de meio LB líquido, adicionados com 200 µL de suspensão bacteriana oriundas de culturas crescidas sob agitação a 190 rpm, por 14 horas, a 28°C ajustada a concentração para  $6,2 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (DO<sub>620</sub>=0,8).

Os escleródios foram mantidos a 28°C, sob agitação a 190 rpm, por 24 horas, e após o período de incubação foram transferidos para placas de Petri com meio BDA e incubados a 28°C durante 72 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, cada parcela experimental foi composta por uma placa contendo quatro escleródios, e cinco repetições. A ação inibitória de *Pseudomonas* ssp. sobre a germinação de escleródios foi determinada observando-se se houve o crescimento micelial em comparação com o tratamento controle, que foi composto apenas dos escleródios em meio LB sem a inoculação de *Pseudomonas*, mantidos sobre as mesmas condições que os demais tratamentos.

## 3.4 ANÁLISES MOLECULARES

### 3.4.1 Extração de DNA

Uma colônia isolada de cada bactéria procedente de placas de Petri contendo meio de cultura LB (Luria Bertani) sólido foi transferida para tubos de ensaio de vidro contendo meio LB líquido, mantida a 28°C sob agitação a 190 rpm durante 12 horas. Para a obtenção de massa celular bacteriana, o meio líquido foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante dos isolados bacterianos foi submetido à extração de DNA usando-se o kit “GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits” (Sigma aldrich, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA) e diluído à concentração final de 25 ng µL<sup>-1</sup>.

### 3.4.2 Reações de PCR e sequenciamento dos genes 16S rDNA e *rpoB*.

As reações de PCR foram conduzidas em volume de 50 µL composta por 2,5 Mm de MgCL<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNtps; 5 µM de cada primer e 0,05 U de Taq polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando de 54°C a 63°C (de acordo com o primer utilizado) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e por fim a extensão final e 72°C por 5 minutos (Tabela1).

Os produtos de PCR foram enviados e submetidos à reação de sequenciamento (CREBIO, Jaboticabal/SP), utilizando-se sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e as sequências foram analisadas e alinhadas no programa Geneious R 9.0.5 (Biomatters, Nova Zelândia).

Para a identificação dos isolados foram utilizadas as sequências disponíveis nos bancos de dados do NCBI. As sequências dos genes 16S rDNA e *rpoB* de espécies conhecidas de *Pseudomonas* foram utilizadas para o teste de hipóteses quanto à identidade dos isolados obtidos, usando reconstrução filogenética.

**Tabela 1** – Sequências dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas na amplificação das reações de PCR de fragmentos dos genes 16S rDNA e *rpoB*.

| Genes       | Iniciadores (Primers) | Sequências (5'- 3')     | Tamanho (pb) | Temperatura de anelamento (°C) | Referências          | Tamanho do fragmento (pb) |
|-------------|-----------------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 16S rDNA    | F311-Os               | CTGGTCTGAGAGGATGATCAGT  | 22           | 63                             | Milling et al., 2004 | 1150                      |
|             | R1459-Os              | AATCACTCCGTGGTAACCGT    | 20           |                                |                      |                           |
| 16S rDNA    | PAGSF                 | GACGGGTGAGTAATGCCTA     | 19           | 54                             | Spilker et al., 2004 | 618                       |
|             | PAGSR                 | CACTGGTGTTCCCTTCCTAA    | 20           |                                |                      |                           |
| <i>rpoB</i> | LAPS                  | TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT  | 22           | 60                             | Tayeb et al., 2005   | 1229                      |
|             | LAPS27                | CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG | 22           |                                |                      |                           |

### 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTES NO BIOCONTROLE *in vivo* DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA CAUSADAS POR *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

#### 3.5.1 Tratamento de sementes com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes

Com base na etapa anterior das análises *in vitro*, para este estudo, foram utilizados três isolados de *Pseudomonas* fluorescentes que foram selecionados como potenciais agentes de biocontrole.

Os isolados bacterianos foram cultivados em erlenmeyers contendo 20mL de meio de cultura LB líquido, mantidos a 28°C sob agitação a 190 rpm durante 14 horas. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e então suspensa em meio LB fresco. O processo foi realizado três vezes, porém após a última centrifugação foi adicionado água esterilizada à suspensão e ajustada a concentração para  $6,2 \times 10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (DO<sub>620</sub> = 0,8). Com as suspensões bacterianas obtidas, os três tratamentos foram realizados separadamente em sementes de *U. brizantha* cv. Marandu, uma hora antes da semeadura.

A semeadura foi realizada em vasos com capacidade de 500 mL contendo substrato comercial e vermiculita na proporção de 3:1.

Após a germinação, deixou-se cinco plantas por vaso, e foi realizada a aplicação de adubo químico de formulação NPK 10-10-10 nas plantas com aproximadamente 20 dias após a germinação.

No experimento foram realizados oito tratamentos: um tratamento para cada um dos três isolados de *Pseudomonas* testados com inoculação da mistura de três isolados de *R. solani*, um tratamento para cada um dos três isolados de *Pseudomonas* sem inoculação de *R. solani*, um tratamento controle com inoculação da mistura dos três isolados de *R. solani*, e um tratamento controle sem inoculação.

Para a produção do inóculo, grãos de arroz parboilizados e esterilizados foram transferidos para placas de Petri limpas contendo discos de colônias com sete dias de crescimento de uma mistura dos isolados de *R. solani* MTUB04E, MTUB05A e MTUB01C. Os grãos de arroz foram mantidos nas placas por cinco dias, a temperatura de 28°C, para que fossem colonizados pelo micélio fúngico. A inoculação foi realizada 30 dias após a emergência das plantas. O inóculo consistiu de meio grão de arroz colonizado, o qual foi posicionado nas folhas próximas à base



das plantas, sendo realizada a inoculação de uma folha por planta. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara-úmida, em casa de vegetação com temperatura diurna de 30°C(±3°C) e noturna de 25°C(±3°C). O experimento foi delineado em blocos casualizados, com quatro repetições e repetido uma vez.

A avaliação dos sintomas de doença foi realizada sete dias após a inoculação, fotografando-se o conjunto de plantas de cada parcela experimental determinando-se a área foliar infectada com o auxílio do software de análise de imagens Assess da APS (ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI, 2008).

### 3.5.2 Aplicação foliar de isolados de *Pseudomonas fluorescentes*

Os mesmos isolados bacterianos utilizados no tratamento de sementes foram utilizados nesse estudo. A obtenção da suspensão bacteriana foi realizada como descrito anteriormente.

Com as suspensões bacterianas obtidas, a aplicação foi realizada com base em dose recomendada para produtos biológicos comerciais de 8L de produto comercial/ha. O experimento consistiu de três tratamentos correspondentes a cada bactéria, aos 30 dias após a emergência das plantas de *U. brizantha* cv. Marandu.

As plantas foram semeadas em vasos com capacidade de 500 mL contendo substrato comercial e vermiculita na proporção de 3:1. Após a germinação, deixou-se cinco plantas por vaso, e foi realizada a aplicação de adubo químico de formulação NPK 10-10-10 nas plantas com aproximadamente 20 dias após a germinação.

No experimento foram realizados oito tratamentos: um tratamento para cada um dos três isolados de *Pseudomonas* testados com inoculação da mistura de três isolados de *R. solani*, um tratamento para cada um dos três isolados de *Pseudomonas* sem inoculação de *R. solani*, um tratamento controle com inoculação da mistura dos três isolados de *R. solani*, e um tratamento controle sem inoculação.

Para a produção do inóculo, grãos de arroz parboilizados e esterilizados foram transferidos para placas de Petri limpas contendo discos de colônias com sete dias de crescimento de uma mistura dos isolados de *R. solani* MTUB04E, MTUB05A e MTUB01C. Os grãos de arroz foram mantidos nas placas por cinco dias, a

temperatura de 28°C, para que fossem colonizados pelo micélio fúngico. A inoculação do patógeno foi realizada 72 horas após a inoculação das suspensões bacterianas.

Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara-úmida, em casa de vegetação com temperatura diurna de 30°C(±3°C) e noturna de 25°C(±3°C).

O experimento foi delineado em blocos casualizados, com cinco repetições e repetido uma vez.

A avaliação dos sintomas de doença foi realizada sete dias após a inoculação, fotografando-se o conjunto de plantas inoculadas determinando-se a área foliar infectada com o auxílio do software de análise de imagens Assess da APS (ASSESS: Image AnalysisSoftware for Plant Disease Quantification, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI, 2008).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 POTENCIAL DE BIOCONTROLE *in vitro* DE *Pseudomonas* spp. SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *R. solani* AG-1 IA

Detectaram-se diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) na inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em 24 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes, dos 123 isolados testados (Tabela 2, Figura 1 e 2). A análise conjunta de dois experimentos não indicou diferenças significativas entre a média da inibição do crescimento micelial da réplica 1 e da réplica 2. O efeito da interação réplica\*isolados foi não significativo, indicando completa reprodutibilidade das observações, independente do experimento.

Combinando-se as réplicas, a análise conjunta dos dados indicou diferenças significativas na inibição do crescimento micelial entre os isolados analisados ( $p=0,0000$ ).

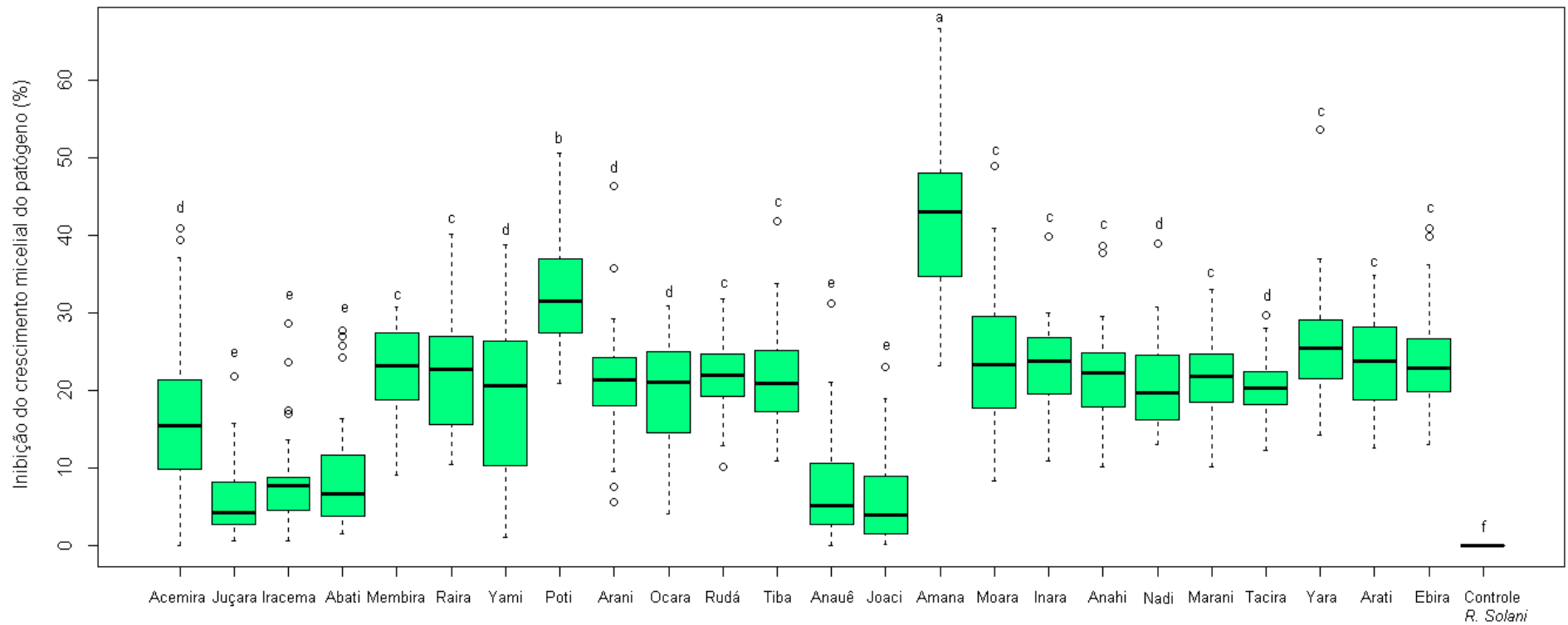
**Tabela 2** – Efeitos sobre a inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por isolados de *Pseudomonas* fluorescentes.

| Experimentos    | Fontes de variação                         | GL  | QM      | F<br>calculado | P                    |
|-----------------|--|-----|---------|----------------|----------------------|
| (Réplica 1 e 2) | Réplicas                                   | 1   | 116,19  | 2,156          | 0,1425 <sup>NS</sup> |
|                 | Isolados de <i>Pseudomonas</i>             | 23  | 2017,80 | 37,438         | 0,0000 *             |
|                 | Réplicas*Isolados de<br><i>Pseudomonas</i> | 23  | 19,52   | 0,362          | 0,9976 <sup>NS</sup> |
|                 | Erro                                       | 672 | 53,89   |                |                      |
|                 | Isolados de <i>Pseudomonas</i>             | 23  | 2017,80 | 38,17          | 0,0000 *             |
|                 | Erro                                       | 696 | 52,85   |                |                      |

Fonte: próprio autor.

\*Significativo pelo teste  $F$  a  $p \leq 0,05$  e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez.

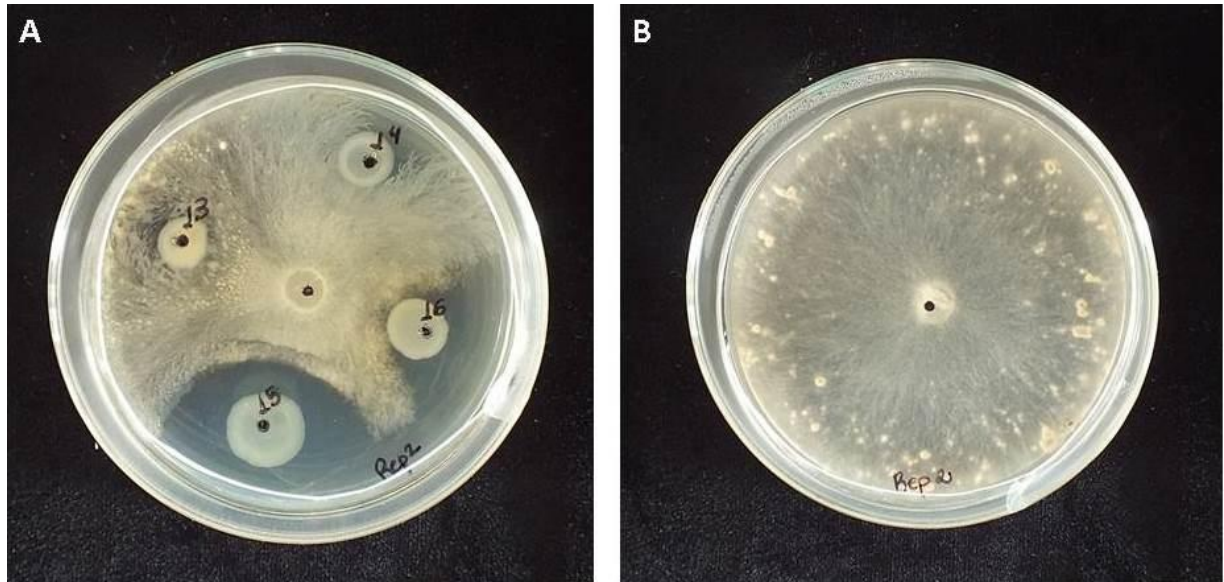
**Figura 1** – Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA pela atividade antifúngica de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.



Fonte: próprio autor.

\* O valor da mediana de cada *box-plot* representa a porcentagem de inibição média de 5 repetições de cada um dos isolados. As letras acima de cada boxplot indicam a diferença significativa com  $p \leq 0,05$  pelo teste Scott-Knott.

**Figura 2** – Teste de antagonismo em placas de Petri, (A) Isolados de *Pseudomonas* spp. inibindo o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e (B) refere-se ao tratamento controle apenas com o patógeno.



Fonte: próprio autor.

A porcentagem de inibição média do crescimento micelial do patógeno variou de 5,97% a 41,83% entre os isolados testados. Os isolados Yara, Poti e Amana foram os que apresentaram mais eficiência no controle micelial do patógeno apresentando áreas de inibição de 26,13%, 32,36% e 41,83%, respectivamente.

Nos testes realizados sobre a inibição da germinação de escleródios de isolados de *R. solani* AG-1 IA, detectaram-se diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os 24 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes testados (Tabela 3, Figura 3). A ação inibitória média entre os isolados variou de 10,84% a 100% de inibição do número total de escleródios analisados.

Dos 24 isolados testados, sete apresentaram inibição de 100% na germinação de escleródios.

Os isolados Amana, Poti e Yara que apresentaram as maiores áreas de inibição no crescimento micelial do patógeno, tiveram a inibição média acima de 50% sobre a germinação de escleródios, sendo 65%, 79,17% e 100%, respectivamente.

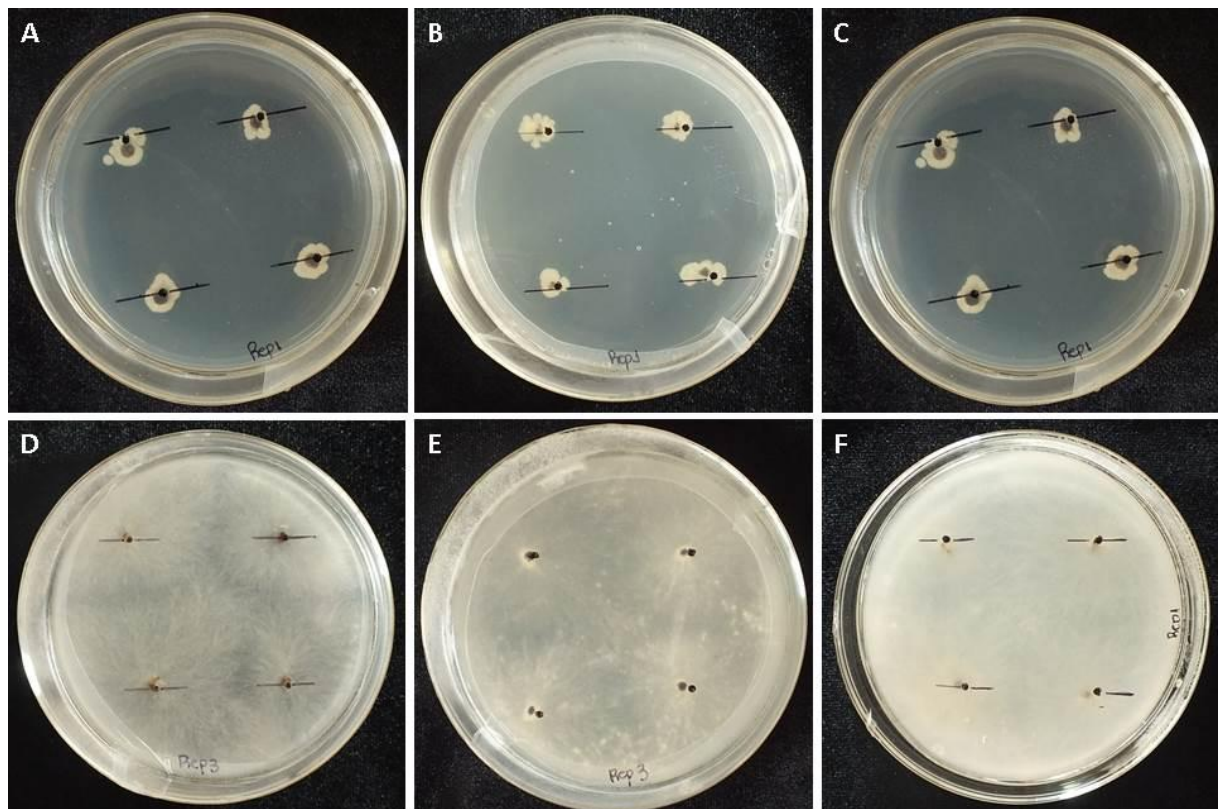
**Tabela 3** – Inibição da germinação de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por atividade antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

| Experimentos    | Fontes de variação                      | GL  | QM      | F calculado | P                    |
|-----------------|---|-----|---------|-------------|----------------------|
| (Réplica 1 e 2) | Réplicas                                | 1   | 226,88  | 1,91        | 1,074 <sup>NS</sup>  |
|                 | Isolados de <i>Pseudomonas</i>          | 23  | 4216,88 | 35,58       | 0,0000 *             |
|                 | Réplicas*Isolados de <i>Pseudomonas</i> | 23  | 127,21  | 1,07        | 0,3780 <sup>NS</sup> |
|                 | Erro                                    | 192 | 118,49  |             |                      |
|                 | Isolados de <i>Pseudomonas</i>          | 23  | 4216,88 | 35,16       | 0,0000 *             |
|                 | Erro                                    | 216 | 119,92  |             |                      |

Fonte: próprio autor

\*Significativo pelo teste *F* a  $p \leq 0,05$  e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

**Figura 3** – Inibição da germinação de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, sendo (A) escleródios do isolado MTUB01C, (B) MTUB04E e (C) MTUB05A, inoculados com o isolado bacteriano Yara (D), (E) e (F) representam os tratamentos controle, que foi inoculado apenas escleródios do patógeno.



Fonte: próprio autor

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. fluorescentes

Os 24 isolados que apresentaram inibição no crescimento micelial o patógeno foram submetidos ao sequenciamento da região 16S rDNA (920 pb) e *rpoB* (800 pb) foram analisados via BLASTn, e após observadas similaridades entre 98 a 100%, as espécies do gênero *Pseudomonas* do banco de dados foram selecionadas para análise filogenética.

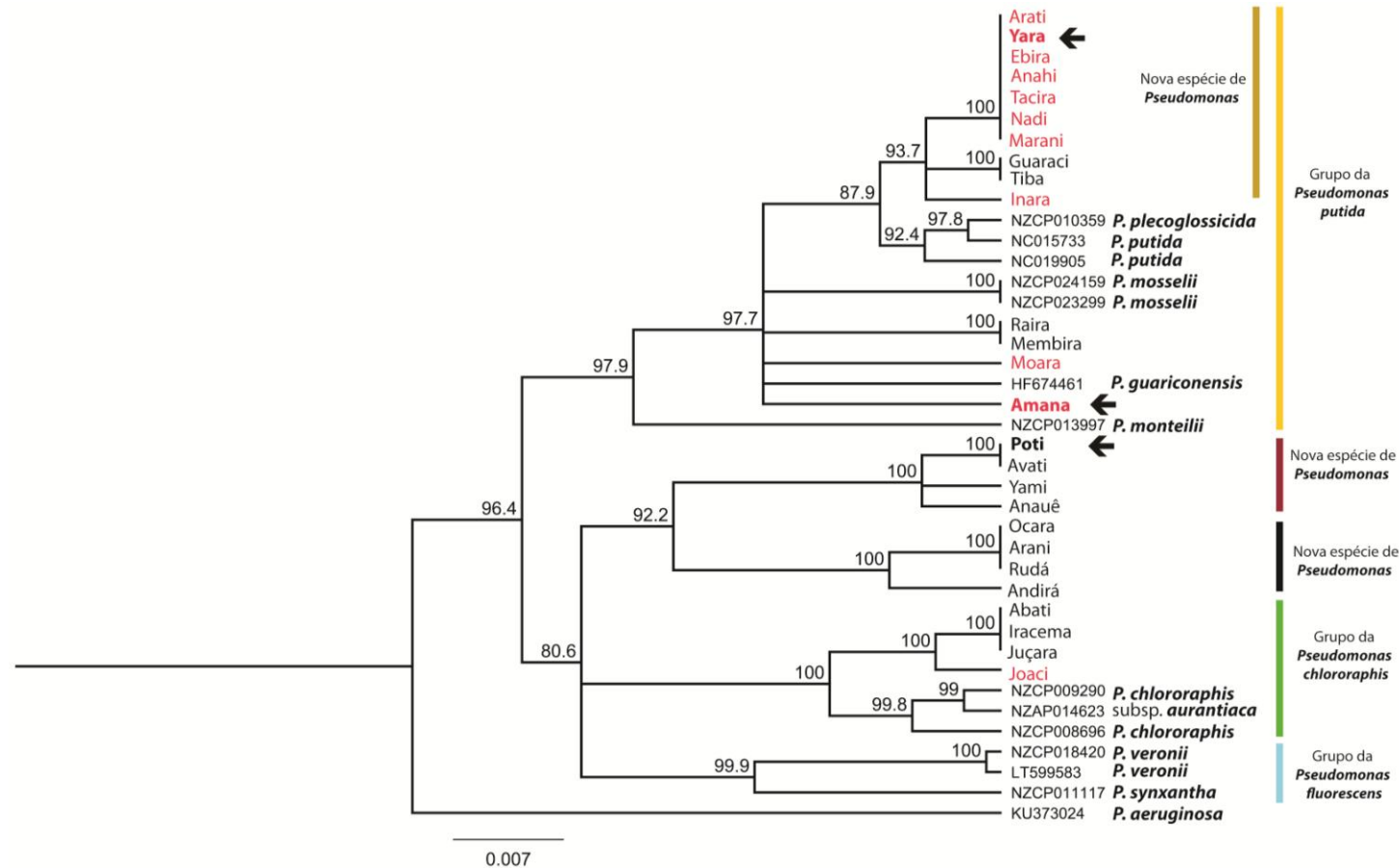
A árvore filogenética gerada, apresentou 6 grupos filogenéticos dentro do gênero *Pseudomonas* (Figura 4).

Foi possível observar que o primeiro grupo, representado pelo grupo das *Pseudomonas putida*, compreendeu 10 isolados deste trabalho, destacando-se os isolados Amana e Yara, selecionados como potenciais agentes de biocontrole. Porém, apesar da proximidade dos isolados Arati, Yara, Ebira, Anahi, Tacira, Nadi e Marani no grupo das *Pseudomonas putida*, os isolados podem ser considerados membros de um segundo grupo observado, um grupo de uma nova espécie de *Pseudomonas*.

O terceiro grupo que compreende os isolados Poti, Avati, Yami e Anauê, não apresentou similaridade próxima a nenhuma sequência selecionada do banco de dados, sendo considerados como pertencentes a um novo grupo de *Pseudomonas*. O mesmo vale para o quarto grupo a ser formado, compreendendo os isolados Ocara, Arani, Rudá e Andirá.

Os isolados Abati, Iracema, Juçara e Joaci se agruparam no quinto grupo formado, o grupo da *Pseudomonas chlororaphis*. Já o último grupo foi composto apenas por sequências do banco de dados, formando o grupo da *Pseudomonas fluorescens*.

**Figura 4** – Árvore filogenética baseada em sequências dos genes 16S e *rpoB* de espécies selecionadas do gênero *Pseudomonas* representando vários grupos filogenéticos dentro deste gênero.



A árvore filogenética foi construída usando o método UPGMA, modelo de distância genética HKY e o programa Genious 9.0.5. Os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apresentados apenas valores acima de 75. As sequências de *P. aeruginosa* foram utilizadas como grupo externo. As setas indicam os agentes de biocontrole em potencial. Os isolados marcados em vermelho foram obtidos de solos de Rondônia e os isolados em preto foram obtidos de solos do Mato Grosso.



### 4.3 POTENCIAL DE ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. FLUORESCENTES NO BIOCONTROLE *in vivo* DA QUEIMA-DAS-FOLHAS EM BRAQUIÁRIA

#### 4.3.1 Tratamento de sementes com isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes

Detectaram-se diferenças significativas entre os tratamentos no experimento onde sementes de braquiária foram submetidas à inoculação, comparando-se os isolados bacterianos Amana, Poti e Yara com os tratamentos controles. Entretanto, não houve diferença estatística entre os isolados bacterianos testados pelo teste de Scott Knott a  $p \leq 0,05$  (Tabela 4, Figura 5).

**Tabela 4** – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos de sementes com isolados de *Pseudomonas* fluorescentes para o controle das lesões causadas por uma mistura de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

| Experimentos           | Fontes de variação  | GL | QM      | F calculado | P                    |
|------------------------|---------------------|----|---------|-------------|----------------------|
| Tratamento de sementes | Réplica (1 e 2)     | 1  | 45,65   | 0,48        | 0,4900 <sup>NS</sup> |
|                        | Tratamentos         | 7  | 1639,85 | 17,40       | 0,0000 *             |
|                        | Blocos              | 3  | 256,10  | 2,718       | 0,0556 <sup>NS</sup> |
|                        | Réplica*Tratamentos | 7  | 167,45  | 1,777       | 0,1155 <sup>NS</sup> |
|                        | Erro                | 45 | 139,95  |             |                      |
|                        | Tratamentos         | 7  | 1639,85 | 15,509      | 0,0000*              |
|                        | Blocos              | 7  | 149,25  | 1,412       | 0,2222 <sup>NS</sup> |
|                        | Erro                | 49 | 105,73  |             |                      |

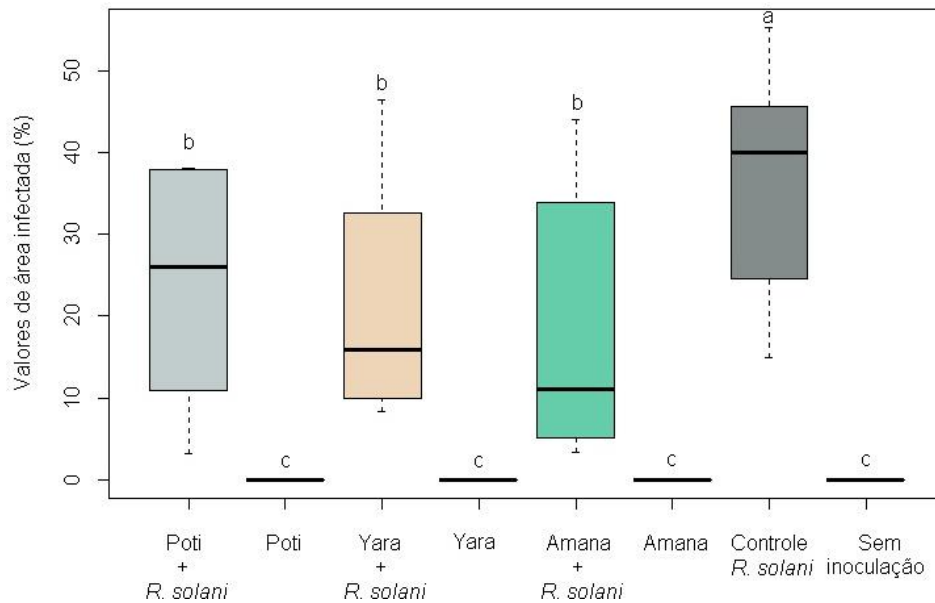
Fonte: próprio autor

\*Significativo pelo teste  $F$  a  $p \leq 0,05$  e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

Foram observados níveis médios e estatisticamente semelhantes de valores de área infectada por *R. solani* nos tratamentos de sementes com os isolados bacterianos. A área infectada em plantas de *U. brizantha* submetidas aos tratamentos variou de 18,43% a 23,78%. Não foram observadas alterações nas plantas submetidas apenas aos tratamentos de sementes sem à inoculação do

patógeno, porém houve um atraso de mais de vinte dias na germinação em todos os tratamentos em que as sementes foram tratadas.

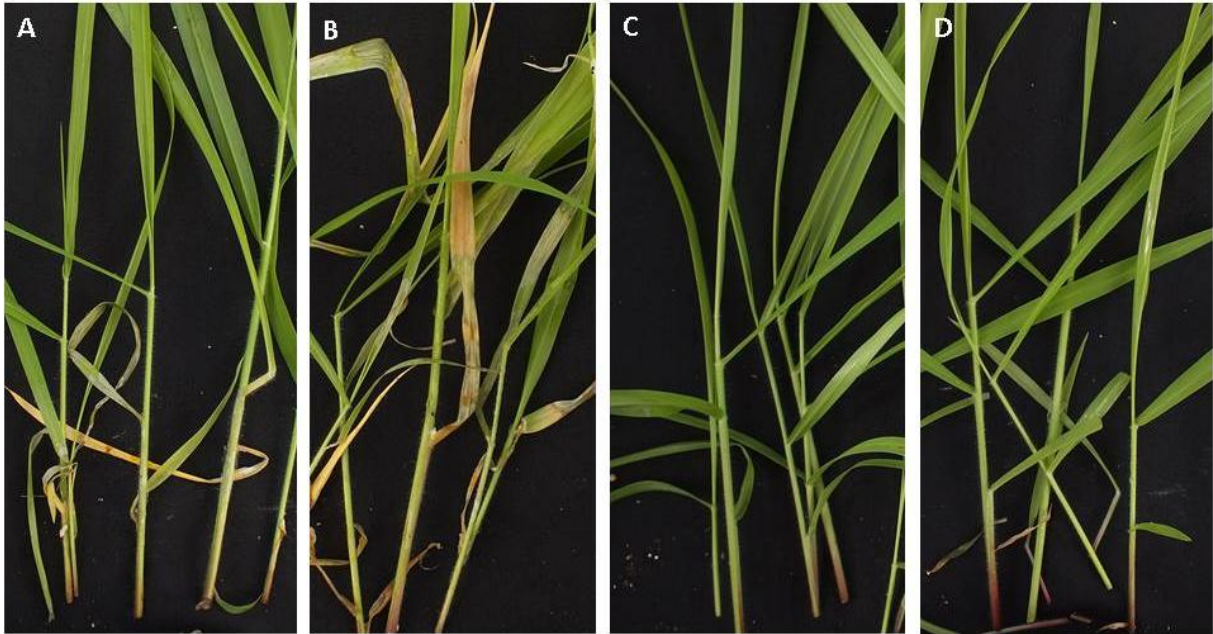
**Figura 5** – Valores de área infectada com sintomas *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em plantas de braquiária cv. Marandu submetidas à aplicação dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* spp. fluorescentes via semente.



Fonte: próprio autor.

Médias seguidas das mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott a  $p \leq 0,05$ .

**Figura 6** – Sintomas em plantas de braquiária cv. Marandu com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (A) com inoculação via semente do isolado de *Pseudomonas* fluorescentes Amana, e (B) apenas com a inoculação do patógeno; (C) e (D) representam os controles apenas com a aplicação do isolado bacteriano e sem inoculação, respectivamente.



Fonte: próprio autor.

#### 4.3.2 Aplicação foliar de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes

Detectaram-se diferenças significativas entre os tratamentos no experimento em que plantas de braquiária foram submetidas à inoculação foliar, a  $p \leq 0,05$  (Tabela 6, Figura 8).

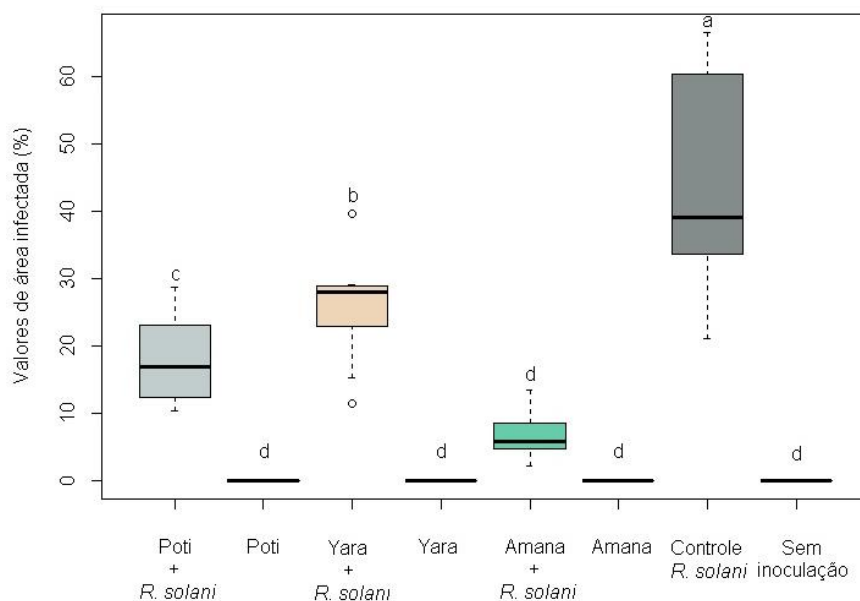
**Tabela 5** – Análise de variância dos efeitos dos tratamentos submetidos à aplicação foliar de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes para o controle das lesões causadas por uma mistura de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

| Experimentos     | Fontes de variação  | GL | QM      | F calculado | P                    |
|------------------|---------------------|----|---------|-------------|----------------------|
| Aplicação foliar | Réplica (1 e 2)     | 1  | 0,0005  | 0,000       | 0,9973 <sup>NS</sup> |
|                  | Tratamentos         | 7  | 2562,04 | 54,62       | 0,0000 *             |
|                  | Blocos              | 4  | 79,65   | 1,698       | 0,1623 <sup>NS</sup> |
|                  | Réplica*Tratamentos | 7  | 5,45    | 0,116       | 0,9970 <sup>NS</sup> |
|                  | Erro                | 60 | 72,86   |             |                      |
|                  | Tratamentos         | 7  | 2562,04 | 57,64       | 0,0000*              |
|                  | Blocos              | 9  | 41,24   | 0,928       | 0,5074 <sup>NS</sup> |
|                  | Erro                | 63 | 44,44   |             |                      |

Fonte: próprio autor.

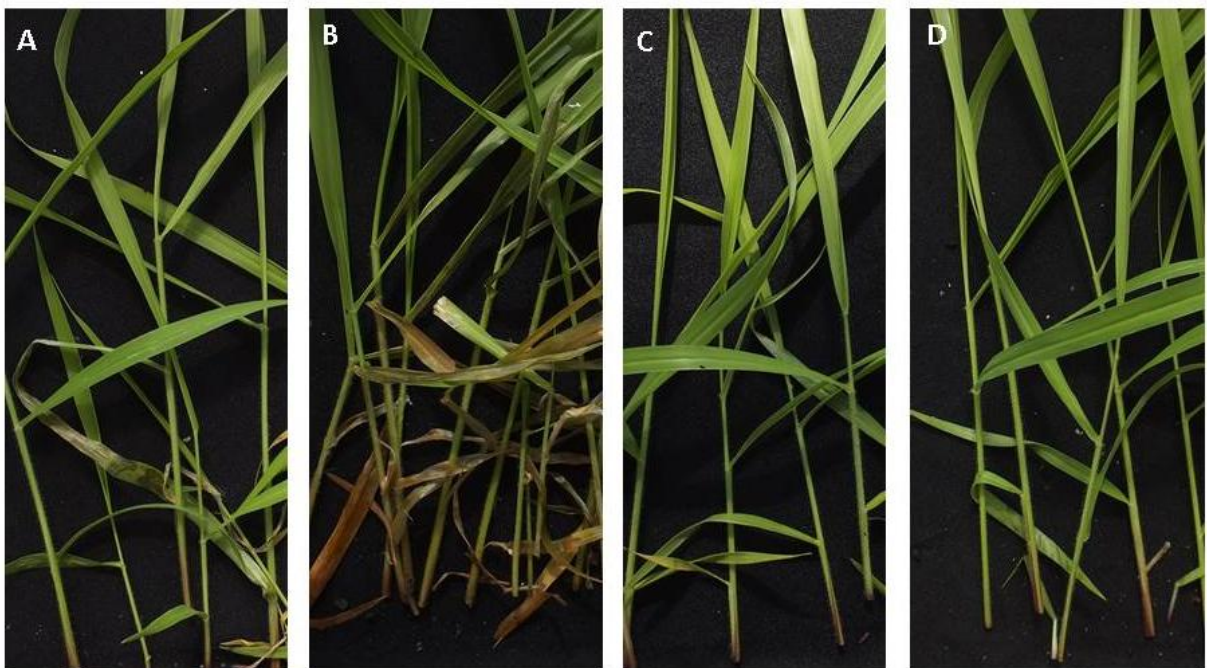
\*Significativo pelo teste *F* a  $p \leq 0,05$  e não significativo (NS), O experimento foi repetido uma vez, Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados,

**Figura 7** – Valores de área infectada com sintomas *Rhizoctonia solani* AG1-IA em plantas de braquiária cv. Marandu submetidas à aplicação foliar dos isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes.



O tratamento inoculado com o isolado Amana apresentou em média menor área foliar infectada, observando-se o valor de 6,87%, enquanto os tratamentos representados pelos isolados Poti e Yara apresentaram 17,7% e 25,85%, respectivamente.

**Figura 8** – Sintomas em plantas de braquiária cv. Marandu com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (A) com inoculação foliar do isolado de *Pseudomonas fluorescens* Amana, e (B) apenas com a inoculação do patógeno; (C) e (D) representam os controles apenas com a aplicação do isolado bacteriano e sem inoculação, respectivamente.



Fonte: próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados das análises filogenéticas indicaram uma grande variedade de indivíduos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* entre os isolados analisados. De fato, a riquíssima diversidade microbiana presente em solos não perturbados do bioma Amazônico, possuem espécies ainda não descritas como observado entre os isolados do presente trabalho, que não se agruparam nos grupos já descritos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Muito embora o gene 16S seja considerado a base da classificação de indivíduos bacterianos, incluindo espécies do gênero *Pseudomonas* (ANZAI et al., 2000), no momento sabe-se que os indivíduos não podem ser diferenciados apenas pela análise desse gene, necessitando de análises de outras sequências de genes como, por exemplo, o gene *rpoB* utilizado nesse estudo, além de vários outros utilizados para diferenciação de espécies de *Pseudomonas* como *recA*, *atpD*, *carA*, *gyrB* (AIT TAYEB et al., 2005; PEIX et al., 2007).

A variação na ocorrência de antagonismo *in vitro* entre os isolados analisados pode ser reflexo da diversidade microbiana que os mesmos apresentaram. Podemos observar padrões semelhantes nas porcentagens de inibição do crescimento micelial do patógeno, entre os isolados que pertencem ao mesmo grupo de *Pseudomonas*, o que de fato comprova que os mesmos podem pertencer à espécies filogeneticamente similares.

Os resultados obtidos no antagonismo *in vitro* no presente trabalho apresentaram-se semelhantes em estudos realizados por MRABET et al. (2013) onde observou-se que entre diferentes linhagens de *Pseudomonas* do grupo fluorescente retiradas de amostras de solo, dois isolados mostraram atividade antagonista contra *R. Solani* com inibição micelial de mais de 30%.

A sobrevivência do patógeno por longo período, na ausência de hospedeiro ocorre por meio de estruturas de resistência, como é o caso dos escleródios formados por *R. solani*. Medidas que visam a redução na fonte de inóculo do patógeno no campo são de extrema importância no manejo de doenças. A utilização de *Pseudomons* fluorescentes como antagonistas que além de inibir o crescimento micelial do patógenos possam reduzir consideravelmente as estruturas de resistência do patógeno tem se mostrado efetivo em vários estudos.

Nosso estudo mostrou que a inibição na germinação de escleródios pode chegar a até 100% utilizando-se isolados de *Pseudomonas* fluorescentes. Tal fato vai de encontro ao que se tem relatado por Neha et al. (2016), onde a inibição da germinação de escleródios de *R. solani* por *P. fluorescens* apresentou-se significativamente reduzida.

Nos ensaios em casa de vegetação, tanto o tratamento de sementes quanto o foliar apresentaram níveis consideráveis de diminuição dos sintomas da área foliar infectada pelo patógeno, apesar dos resultados em casa de vegetação no tratamento de sementes não ter apresentado diferenças entre os isolados analisados. Na inoculação via sementes observamos um atraso considerável na germinação das plantas. Tal fato pode ser explicado devido à alta capacidade de dormência das sementes da maioria das gramíneas forrageiras tropicais devido a vários fatores como alternância de luz e temperatura, associadas a variações na umidade e contato de microrganismos e de ácidos orgânicos do solo, que pode dificultar a determinação da qualidade fisiológica, além da emergência das plântulas na área de cultivo e conseqüentemente o estabelecimento da pastagem (SOUZA, 2001).

A utilização de *Pseudomonas* fluorescentes no controle de doenças foliares importantes em condições de casa de vegetação tem se mostrado eficiente, como no caso de estudos realizados por NAGARAJKUMAR et al. (2005), que demonstrou que o tratamento de sementes seguido de aplicação do solo com formulação de pó de *Pseudomonas* fluorescentes reduziu significativamente a severidade a queima da bainha do arroz, causada por *R. solani* em 75% comparado com o controle.

Mesmo que em alguns casos, em condições de casa de vegetação o nível de controle obtido com o método biológico possa estar em níveis abaixo do que se faz necessário para evitar perdas de produção, o intuito principal do uso do método biológico é a não utilização do mesmo isoladamente, e sim a fazendo-se uso da integração de métodos para melhorar a eficiência na utilização dos mesmos (BETTIOL; GHINI, 2001).

O presente trabalho teve grande contribuição em obter isolados de *Pseudomonas* fluorescentes como potencial de biocontrole da queima-das-folhas em braquiária para que possam ser incorporados no portfólio de uma indústria de bioprodutos para a agricultura. Certamente serão necessários experimentos de campo conduzidos na região de ocorrência da doença no norte do Brasil, para se

confirmar o potencial de biocontrole dos agentes selecionados, além de estudos sobre doses e melhores épocas de aplicação.



## 6 CONCLUSÃO

A identificação molecular dos isolados apresentou uma grande diversidade de indivíduos pertencentes a diferentes grupos de *Pseudomonas*.

Os indivíduos selecionados *in vitro* possuem alto potencial como agentes de biocontrole *in vivo* da queima-das-folhas em braquiária, mostrando resultados mais satisfatórios na aplicação foliar, por sua vez, o isolado Amana apresentou um alto potencial biocontrolador do patógeno.

## REFERÊNCIAS

- AIT TAYEB, L.; AGERON, E.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 5, p. 763-773, 2005.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 4, p. 1563-1589, 2000.
- ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; LASCANO, C. E. Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrido CIAT 36061). Gramínea de alta produção y calidad forrajera para los trópicos. Palmira, p. 24, 2005.
- ATKINSON, D.; MCKINLAY, R. G. Crop protection and its integration within sustainable farming systems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v.64, p. 87-93, 1997.
- BAUTISTA, G.; MENDOZA, H.; URIBE, D. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. **Acta biológica Colombiana**, Bogotá, v. 12, p. 19-32, 2007.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, p. 919-929, 1996.
- BERNARDES, F. S. **Rizobactérias na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos**, 58 f Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical)\_ Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2006.

- BETÍNEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, n.4, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**, Recife: UFRPE, p.14, 2001.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas**, Jaguariúna: SP, p.341, 2009.
- BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease**, Chichester, v. 69, p. 599-601, 1985.
- CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; NASS, H. Mancha bandeada en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 12, n. 2, p. 32-33, 1999.
- CEDEÑO, L.; NASS, H.; CARRERO, C.; CARDONA, R.; RODRÍGUEZ, H.; ALEMÁN, L. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 9, p. 6-9 1996.
- CHAVARRO MESA, E.; CERESINI, P. C.; RAMOS MOLINA, L. M.; PEREIRA, D. A. S.; SCHURT, D. A.; VIEIRA, J. R.; POLONI, N. M.; MCDONALD, B. A. The *Urochloa* foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in south America via a host shift from rice. **Phytopathology**, St. Paul, v. 105, n. 11, p. 1475-1486, 2015.
- CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, n. 1, p. 13-23, 2000.

COSTA-SOUZA, E.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33 n. 2, p. 129-136, 2007.

CRISPIM, S. M. A.; BRANCO, O. D. **Aspectos Gerais das Braquiárias e suas características na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS.** Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2002. (Divulgação Técnica n° 33).

DUARTE, M. D. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiara brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

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

GOULD, W. D.; HAGEDORN, C.; BARDINELLI, T. R.; ZABLOTOWICZ, R. M. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent *Pseudomonads* from various habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 28-32, 1984.

HASHIBA, T.; KOBAYASHI, T. Rice diseases incited by *Rhizoctonia* species. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.331-340, 1996.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, p. 885-885, 1980.

- KO, W.; HORA, F. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, n. 61, p. 707-710, 1971.
- LAMARI, L. **Assess**: Image analysis software for plant disease quantification. American Phytopatological Society, St. Paul, p. 125, 2008.
- LEE, F. N.; RUSH, M. C. Rice sheath blight: a major rice disease. **Plant Disease**, Chichester, v. 67, n. 7, p. 829-832, 1983.
- LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Chapter Two - The evolution of fungicide resistance. **Advances in applied microbiology**: Academic Press, v.90 p.29-92, 2015.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. **Doenças em plantas forrageiras**, Campo Grande: EMBRAPA Gado de corte, 2011. 32p. Documentos, 187.
- MELO, I. S.; MELO, J. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
- MEYER, M. C.; SOUZA, N. L. Mela sob controle. **Grande culturas Cultivar**, Pelotas, v. 58, n. 58, p. 58, 26-29, 2004.
- MILLING, A.; SMALLA, K.; XAVER MAIDL, F.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.266, p. 23-39, 2004.
- MRABET, M.; DJEBALI, N.; ELKAHOUI, S.; MILOUD, Y.; SAÏDI, S.; TARHOUNI, B.; TARHOUNI, B.; MHAMDI, R. Efficacy of selected *Pseudomonas* strains for biocontrol of *Rhizoctonia solani* in potato. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 3, p. 449-456, 2013.

NAGARAJKUMAR, M.; JAYARAJ, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, Washington, v. 160, n. 3, p. 291-298, 2005.

NEHA, K. V.; BALABASKAR, P.; RAMASAMY, N. Survey and occurrence of *Rhizoctonia solani* (Kuhn) causing sheath blight of rice and in vitro efficacy of bacterial antagonists against *Rhizoctonia solani* (Kuhn). **Environmental Biology**, Ithaca, v. 37, p. 1421-1427, 2016.

O'SULLIVAN, D. J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, n. 4, p. 662-676, 1992.

PEIX, A.; VALVERDE, A.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; MATEOS, P. F.; SANTA-REGINA, I.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, n. 6, p. 1286-1290, 2007.

PERDOMO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ, A.; PINEDA, J.; ALEZONES, J. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *rhizoctonia solani* kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. **Interciencia**, Caracas, v. 32, p. 48-54, 2007.

RAMOS-MOLINA, L. M.; CHAVARRO-MESA, E.; PEREIRA, D. A. D. S.; SILVA-HERRERA, M. D. R.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infects both rice and signalgrass in the Colombian Llanos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, p. 65-71, 2016.

SOUZA, F. H. D. **Produção de sementes de gramíneas forrageiras tropicais**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 2001. Documento técnico, 30.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v.3, p. 28-31, 2001.

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. **Journal of general microbiology**, London, v. 43, n. 17, p. 159-271, 1966.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: EMBRAPA, 2001. Documento Técnico, 50.

WELLER, D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 2, p. 250-256, 2007.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; NORMA, G. ***Pseudomonas* spp . Fluorescentes - bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 34p. Documentos, 127.