

# Utilização de *Pseudomonas fluorescens* no controle biológico de *Macrophomina phaseolina*

SANTOS, P.J.C.<sup>1</sup>; BENATO, L.C.<sup>2</sup>; SOUZA, N.V.<sup>2</sup>; VIEIRA, N.D.<sup>2</sup>; ALMEIDA, A.M.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, PR; <sup>2</sup>Embrapa Soja, Caixa Postal, 231, 86001-970, Londrina, Paraná.

e-mail: amra@cnpso.embrapa.br

## Introdução

A maioria dos solos cultiváveis do mundo tem sido utilizado continuamente, por décadas, com deposição de resíduos e agora mostram pobreza em diversidade biológica, na perda gradual da produtividade. Com esses agravantes a preservação e a conservação do ambiente têm sido cada vez mais importantes nas áreas agricultáveis. Como resultado, o setor produtivo tem buscado tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com melhores enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos.

Fungos fitopatogênicos habitantes do solo, como *Macrophomina phaseolina*, são de difícil controle, principalmente por formarem estruturas de resistência, os microescleródios. O controle químico não tem sido efetivo, nem economicamente viável e, em vista dos problemas ambientais a rotação de culturas e o controle biológico são as melhores opções.

*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.

Este trabalho objetivou verificar se as colônias de *Pseudomonas* possuem a real capacidade de inibir o fungo causador da podridão de carvão, *Macrophomina phaseolina*.

## Material e Métodos

Trinta e três isolados (Tabela1) de *P. fluorescens* foram obtidos de diversas culturas, coletadas em diferentes regiões do Brasil. Esses isolados foram cultivados em meio King-B e colocadas em estufa a 27°C por 48h. Após a incubação as placas de petri foram submetidas a luz ultravioleta (366 nm) para confirmar a fluorescência das colônias.

Para a análise do gene *phlD* foi realizada extração de DNA pelo protocolo de CLERC *et al.* (1988). Em seguida foi feita a reação em cadeia polimerase (PCR) com os primers B2BF (*forward*) e BPR2 (*reverse*) para amplificação de parte do gene *phlD* com 629 pares de base (pb). Os produtos da amplificação foram separados em gel agarose 1,3%, corados com brometo de etídio.

Os 33 isolados foram testados contra o fungo *M. phaseolina*, tanto em meio TSB como BDA (batata dextrose agar), em cada placa um fragmento, de meio mais fungo, com 7mm de diâmetro

foi depositado no centro das placas contendo os meios já citados e após 48h a suspensão de bactéria foi depositada nas placas formando um halo em torno da colônia fúngica, a 4cm da mesma. A inibição de crescimento do fungo foi avaliada após 7 dias.

Tabela 1 - Identificação dos isolados

Identificação	Local de coleta	Cultura	PhId	Inibição
PG34	Ponta Grossa	Trigo	-	+
PG40	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG41	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG43	Ponta Grossa	Aveia	-	-
PG44	Ponta Grossa	Aveia	-	-
PG51	Ponta Grossa	Aveia	-	-
PG45	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG59	Ponta Grossa	Aveia	-	-
PG67	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG68	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG69	Ponta Grossa	Aveia	-	-
PG70	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG71	Ponta Grossa	Aveia	-	+
PG73	Ponta Grossa	Trigo	-	+
PG75	Ponta Grossa	Trigo	-	+
PG76	Ponta Grossa	Aveia	-	+
GP.01	Londrina	Girassol	-	-
GP.06	Londrina	Girassol	-	+
GP.02	Londrina	Girassol	-	-
GN.05	Londrina	Girassol	-	-
AV.P.01	Londrina	Aveia	-	+
AV.N.02	Londrina	Aveia	-	-
AV.N.05	Londrina	Aveia	-	-
MP.02	Londrina	Milho	-	+
MN.05	Londrina	Milho	-	+
SP.01	Londrina	Soja	-	+
SN.01	Londrina	Soja	+	+
NP.01	Londrina	Nabo	-	+
NP.03	Londrina	Nabo	-	+
NN.03	Londrina	Nabo	-	-
TP.02	Londrina	Tremoço	-	-
9.N2.5	USA	----	+	-
GN221P	USA	----	+	-

## Resultados e Discussão

Dos 33 isolados selecionados apenas três foram positivos para o gene *phId*: *SN.01*, *9.N2.5* e *GN221P*.

Dezenove isolados foram capazes de inibir *M. phaseolina* em ambos os meios. A maior eficiência foi do isolado PG45 que chegou a inibir em 54,2% o crescimento de *Macrophomina phaseolina* em meio BDA. (Fig 2 e 3)

*Pseudomonas fluorescens* possuem a capacidade de produção de diversos antibióticos e não só o 2,4-DAPG.

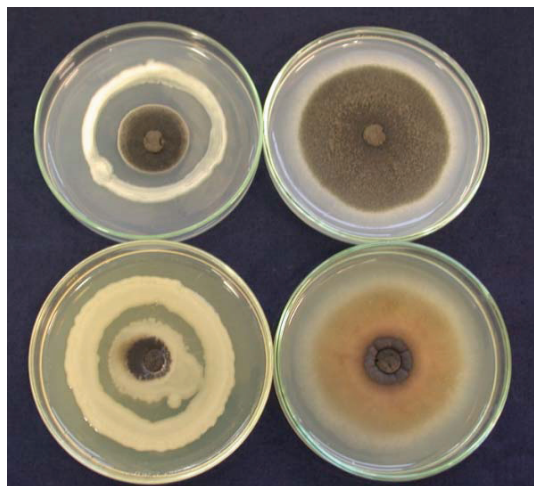


Figura 2 *P. fluorescens* inibindo *Macrophomina*, em comparação com a testemunha à direita.

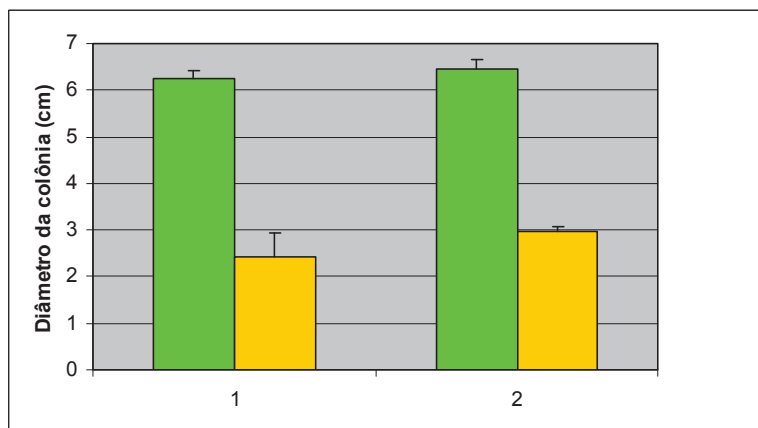


Figura 3 Inibição apresentada pelo isolado PG45 em meio TSB e BDA.

## Conclusões

*Pseudomonas fluorescens*, inibiu o desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina*, mostrando potencial para o uso no controle biológico desse fungo. *P. fluorescens* deve ser testada contra outros fitopatógenos.

## Referências

- ABAWI, G. S.; WIDMER, T. L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n.1, p. 37-47, 2000.
- AMORIN, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.246-267, 1995.
- CATTELAN, A.J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatôgenicos de solo e de sementes de soja. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, v.18 p. 37-42, 1994.
- CLERC, A.; MANCEAU, C.; NESME, X. Comparison of Randomly Amplified Polymorphic DNA with Amplified Fragment Length polymorphism To Assess Genetic Diversity and Genetic Relatedness within Genospecies III of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p.1180-1187, Apr.1998.
- GARDENER, B. B.; MAVRODI, D. V.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, Minn., v.91, n° 1, p.44-54, Jan, 2001.
- HEIM, S., KIEWITZ, C., EISEN, J. A., TIMMIS, K. N., DUSTERHOFT, A., TUMMLER, B., and FRASER, C. M. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**. n. 4 p. 799-808, 2002.
- LUDLOW, M.M., MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances Agronomy**. v.43 p.107-153, 1990.
- SHORT, G. E., WYLLIE, T. D., AMMON, V. D. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. **Phytopathology**, v. 68 p. 736-741, 1978.