

EFEITO INIBITÓRIO DE CEPAS DE PSEUDOMONAS DO GRUPO FLUORESCENTE SOBRE O CRESCIMENTO DE *ALTERNARIA* *SONALI* SOR, ISOLADO DA CULTURA DA BATATA

INHIBITORY EFFECT OF THE FLUORESCENT GROUP OF THE *PSEUDOMONAS* STRAINS ON THE GROWTH OF *ALTERNARIA SONALI* SOR, ISOLATED FROM POTATO CROPS

Edwin Ronnie Gakegne^{1*} ; Benedicto Martínez Coca²; Odaylín Plasencia Márquez²;
Hernández Rodríguez³; Yeised de La Fe³

¹ Instituto Superior Politécnico Sol Nascente, Huambo, Angola.

² Centro Nacional de Sanidade Agropecuária (CENSA), Mayabeque, Cuba.

³ Faculdade de Biologia-Universidade de Havana (UH), Havana, Cuba.

* Email para correspondência: ergakegne@gmail.com

RESUMO

A pinta preta da batata, causada por *Alternaria solani*, é uma das doenças foliares mais difundidas e uma das mais importantes nesta cultura no mundo. Tradicionalmente, o controle desse patógeno é realizado por meio da aplicação de agroquímicos. No entanto, cada vez mais se promove o uso de diferentes alternativas para reduzir o uso de pesticidas químicos que afetam o ecossistema, entre estas encontra-se o controle biológico com microrganismos ou seus metabólitos. As pseudomonas fluorescentes, pelas qualidades que apresentam, estão entre as mais investigadas a esse respeito. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito antagônico de três cepas de *Pseudomonas* do grupo florescente contra uma cepa patogênica de *A. solani*, de batata. Seu potencial como antagonista contra o patógeno foi determinado em diferentes testes de cultura dupla *in vitro*. As cepas de *Pseudomonas* apresentaram evidente antagonismo, com alto efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno, destacando-se a cepa de *P. protegens* PF5 com maior competência

ABSTRACT

The potato's early blight caused by *A. solani* is one of the most widespread foliar diseases, and one of the most important of this crop wide world. Traditionally, the control of this pathogen is carried out through the application of agrochemicals. However, the use of different alternatives to reduce the use of chemical pesticides that affect the ecosystem is increasingly promoted, among these there is the biological control with microorganisms or their metabolites. The fluorescent pseudomonas are the must investigated for this propose. The objective of the work was to evaluate the antagonistic effect of three strains of *P. fluorescent* against one pathogen strain of *A. solani*, from potato crop. Their potentialities as antagonists on the pathogen was determined in different dual culture tests *in vitro*. The strains of *Pseudomonas* presented evident antagonism, with a high inhibitory effect of the pathogen growth, with outstanding competence for the substrate and apparent



pelo substrato e aparente micoparasitismo. Esses resultados mostram a importância da cepa selecionada, como promissora para o controle biológico desse patógeno na cultura da batata.

Palavras-chave: *Pseudomonas fluorescens*, *Alternaria solani*, controle biológico.

micoparasitism, the strain of *P. protegens* PF5. These results evidence that this strain could be promissory for the biological control of this pathogen in the cultivation of the potato crop.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, *Alternaria solani*, biological control.

Introdução

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) é originário dos Andes e constitui uma das contribuições mais importantes da região andina, por ser um dos alimentos mais consumidos e apreciados e por favorecer decisivamente a segurança alimentar de toda a humanidade (Hernández–Mansilla *et al.*, 2017; Ojeda-Quintana *et al.*, 2020). A batata, juntamente com o milho (*Zea mays* L.), o trigo (*Triticum aestivum* L.) e o arroz (*Oryza sativa* L.), está entre as quatro culturas mais importantes do mundo (Martín e Jerez, 2017; Ojeda-Quintana *et al.*, 2020; Betancourth *et al.*, 2022). Esta cultura é uma fonte de rendimento económico para produtores, comerciantes e industriais em todo o mundo (Ojeda-Quintana *et al.*, 2020). A batata é uma cultura de importância económica internacional, constitui alimento para grandes populações em diferentes regiões do planeta e está distribuída em mais de 140 países onde vivem dois terços da população mundial (Hernández–Mansilla *et al.*, 2017; Ojeda-Quintana *et al.*, 2020). Em Cuba ocupa o primeiro lugar entre raízes e tubérculos; constitui um alimento muito valorizado na alimentação da população, por isso é uma necessidade para cientistas e produtores conseguirem aumentos na produção e qualidade deste tubérculo (MINAG, 2016; Martín e Jerez, 2017).

A cultura da batata é afetada por doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e outros, que infectam diversos órgãos da planta e, em maior ou menor grau, seus rendimentos. Como consequência do fato de que a planta se multiplicar, fundamentalmente, a partir de tubérculos, estes podem espalhar pragas em áreas agrícolas (Acuña *et al.*, 2021). A incidência de doenças causadas por fungos patogénicos constitui um dos principais fatores que limita a produção da cultura da batata na maioria dos países tropicais. Dentre estas, a pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani* Sorauer, é uma das doenças foliares mais significativas da cultura no mundo inteiro (Acuña *et al.*, 2021; Faberi *et al.*, 2022). Esta doença é considerada de grande importância devido à sua rápida disseminação e poder destrutivo, pois ataca folhagens, caules e tubérculos (Acuña *et al.*, 2021; MINAG, 2016), o que leva a perdas de até 30% do rendimento

em áreas com condições climáticas favoráveis (MINAG, 2016; Acuña e Sandoval, 2017; Acuña *et al.*, 2021). A pinta preta, além do cultivo da batata, afeta significativamente o tomate (Ricardo *et al.*, 2013; Chohan *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, em muitos países, produtores da batata, o controle deste patógeno é realizado através da aplicação de fungicidas nas sementes, folhagens e solo com resultados favoráveis (Ahmed, 2017; Gupta *et al.*, 2020). Porém, o uso continuado destes resulta em efeitos nocivos ao meio ambiente, devido à sua toxicidade e residualidade; faz com que se acumulem nas águas, no solo, nas plantas e nos animais, além de gerar resistência em fitopatógenos e prejuízos à saúde humana (Saccsa, 2015; Cang *et al.*, 2018). Apesar do conhecimento existente sobre a doença e seu controle, ela é um dos principais fatores limitantes da produção de batata no mundo (Hollingshead, 2015; Pérez *et al.*, 2016; Ahmed, 2017). Isto adquire maior importância, pois uma maior fertilização com nitrogênio leva ao aumento da incidência de *A. solani* e, com isso, à diminuição da produtividade (Fundora *et al.*, 2010; Acuña *et al.*, 2021).

No mundo, é cada vez mais incentivada a utilização de diferentes alternativas para redução de agrotóxicos que afetam o ecossistema com intuito de produzir alimentos saudáveis, o que justifica plenamente a necessidade de busca por outros métodos menos agressivos para o controle de *A. solani*, como são os Agentes de Controle Biológico (ACB). Dentre estes destacam-se os isolados do gênero *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente (Fontes e Valadares-Inglis, 2020; Betancourth *et al.*, 2022; Carrillo e Ramírez, 2022).

As espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente mais relevantes para a agricultura são *P. fluorescens* e *P. putida*, que ratificaram a eficiência desse gênero no desenvolvimento e produtividade de plantas (Quispe *et al.*, 2022; Adviany *et al.*, 2023). Tais microrganismos são conhecidos principalmente como bactérias promotoras de crescimento de plantas e indiretamente como agentes de controle biológico de doenças de plantas têm sido utilizados para biocontrole (Guimarães *et al.*, 2021; Santos-Torres *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021; Carrillo e Ramírez, 2022; Dias e Santos, 2022). A utilização de agentes de controle biológico bacteriano é uma opção promissora para o controle de doenças.

Neste contexto e com a finalidade de contribuir na solução de problemas de doenças na cultura da batata através da integração de diferentes ferramentas de manejo, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito antagônico de três cepas de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente contra uma cepa patogênica de *A. solani*, patógeno da cultura da batata.



Material e Métodos

Origem de culturas microbianas e produção de inóculo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Nacional de Sanidade Agropecuária (CENSA) (Latitude 22.991867; Longitude -82.153892), província de Mayabeque, Cuba.

Como agente de controle biológico, as cepas *Pseudomonas protegens* Pf-5 (ATCC® cepa referência BAA-477™) isoladas de solo no Texas, EUA (Majumder *et al.*, 2014), *Pseudomonas putida* AJ13 e *Pseudomonas fluorescens* AI05, obtidas da rizosfera da variedade de arroz J - 104 em solo Ferruginoso Cromo-Nodular Gley Vertic, com atividade antagonista contra *Pyricularia grisea* (Sacc.) (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010), cepas pertencentes a Coleção de Culturas Microbianas da Faculdade de Biologia da Universidade de Havana, Cuba.

Para obtenção dos inóculos a serem utilizados em todos os experimentos, as três cepas foram semeadas em placas de Petri contendo meio King B (BIOCEN) e incubadas por 24 h a 28°C. Posteriormente, foram transferidos para tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido de Caldo Nutriente (CN) (BIOCEN) e incubados a 28°C por 48 h em agitação numa saranda de marca Thys 2 a 150 rpm. Transcorrido este tempo, foram preparadas suspensões bacterianas a uma concentração final de 10⁸ UFC assim como o filtrado das mesmas, que foram utilizadas em cada um dos experimentos.

Como agente patogênico, se utilizou a cepa de *Alternaria solani* No. 160, previamente isolado de folhas de batata com sintomas típicos de pinta preta, da província de Las Tunas, pertencente ao acervo do Laboratório de Micologia Vegetal do CENSA. Para obtenção dos inóculos a utilizar, do micélio do fungo se retiraram discos de 5 mm de diâmetro e semeados em placas de Petri com meio Batata Dextrose Agar (PDA) (BIOCEN) se incubaram por sete dias a 30±1°C e no escuro.

Atividade antagônica de cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes contra *A. solani* em diferentes meios de cultura

Para realizar esta experiência, discos de micélio do patógeno foram embebidos durante 5 minutos em cada uma das suspensões de células bacterianas, obtidas conforme descrito anteriormente. Dos discos tratados, alguns foram semeados, individualmente, no centro das placas de Petri (90 mm Ø) com meio PDA e os demais, em nutriente ágar (NA) da mesma forma. As placas, com os discos do patógeno, foram incubadas a 30±1°C no escuro. Os

controles foram tratados da mesma forma que os tratamentos, com a diferença de que alguns discos do fungo foram embebidos em água destilada estéril e outros em meio de cultura NA. Para cada tratamento foram realizadas três repetições.

A atividade antagônica da bactéria foi determinada através de medições do diâmetro de crescimento das colônias do fitopatógeno na presença da bactéria com o uso de uma regra graduada, às 72, 120 e 168 horas. Se utilizou um desenho completamente aleatório. Se determinaram as percentagens de inibição com base no controle, de acordo com a fórmula de Abbott (CIBA-GEIGY, 1981) e processado de acordo com o teste de comparação de proporções (método Wald para correções) (Castillo e Miranda, 2014).

Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas* sp. no crescimento de *A. solani*

Para determinar o efeito fungistático das cepas de *Pseudomonas* sobre o patógeno da batata *A. solani*, das suspensões bacterianas de cada cepa, obtidas conforme descrito anteriormente, 2,5 ml foram filtrados através de filtros milipore de 0,20 µm (Sartorius). Se incorporou separadamente 10 µl das suspensões bacteriana no borde da placa com meio de cultura PDA e igual volume do filtrado da suspensão bacteriana. Se inclinou a placa a um ângulo, estendendo cuidadosamente a gota da suspensão ao longo do comprimento da placa em forma de faixa e se inoculou um disco de *A. solani* nos ambos lados da faixa. Para as placas controles, as faixas foram formadas da água destilada estéril, se inoculou um disco de *A. solani* em ambos lados da faixa.

As placas foram incubadas a 30±1°C e no escuro. Se avaliou o crescimento micelial de *A. solani* com o uso de uma regra graduada, às 72, 120 e 168 horas. Se utilizou um desenho completamente aleatório. Se determinaram as percentagens de inibição com base no controle, de acordo com a fórmula de Abbott (CIBA-GEIGY, 1981) e processado de acordo com o teste de comparação de proporções (método Wald para correções) (Castillo e Miranda, 2014).

Efeito antagônico de cepas de *Pseudomonas* contra *A. solani* através de difusão no meio de cultura

Procedemos conforme descrito por Yesid e Sánchez (2012), para o método de perfuração (poços). Foram feitos quatro furos de 5 mm de diâmetro em placas de Petri com 15 ml de meio de cultura BDA e em cada um deles foram depositados 50 µl de cada suspensão bacteriana, individualmente, com micropipeta.

No centro de cada placa foi colocado um disco de micélio de *A. solani*, obtido de colônias com sete dias de crescimento, e igual volume, mas de água destilada estéril, foi colocado nos poços



controle. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento. O crescimento micelial do patógeno foi avaliado com régua graduada aos 72, 120 e 168 horas. Se utilizou um desenho completamente aleatório. As percentagens de inibição foram determinadas conforme fórmula de Abbott (CIBA-GEIGY, 1981) e processadas conforme teste de comparação de proporções (método de Wald por correções) (Castillo e Miranda, 2014).

Determinação de metabólitos inibidores de crescimento de *A. solani* por difusão no meio de cultura

A cepa bacteriana com maior inibição do crescimento do patógeno na epígrafe 3.4, foi escolhido para determinar a presença de metabólitos com possível atividade tóxica em *A. solani* no meio de cultura. Do experimento anterior, porções (15 x 7 mm) do meio de cultura sem presença visual de crescimento microbiano foram extraídos do zona de interação bactéria-patógeno. As porções extraídas foram depositadas no centro de placas de Petri de 70 mm Ø, com meio de cultura BDA e sobre estas se colocou um disco (5 mm Ø) de micélio do patógeno. O controle consistiu de placas de Petri inoculadas da mesma forma que as anteriores, mas com porções do meio de cultura das placas de controle do experimento anterior. Cinco réplicas foram feitas para cada tratamento. Se avalio o crescimento micelial do patógeno com uma régua graduados, em 72, 120 e 168 horas. Se utilizou um desenho completamente aleatório.

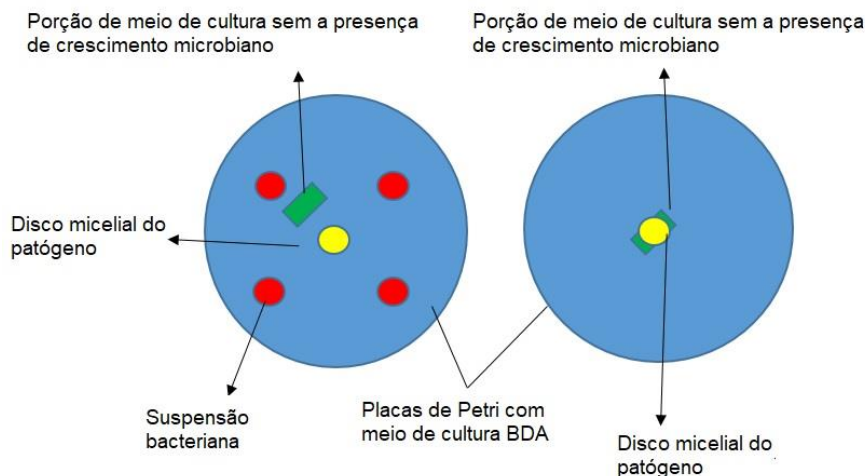


Figura 1. Representação gráfica do método de determinação da presença de metabólitos difusíveis no espaço entre o patógeno (*A. solani*) e a bactéria (*Pseudomonas* spp.).

Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas* no crescimento de *A. solani* (mistura do patógeno no meio de cultura)

A partir de micélio de *A. solani* de colônias que cresceram por uma semana em placas de Petri com meio PDA. Se adicionou fraccionadamente 30 ml de água destilada estéril nas placas de Petri de *A. solani* e cuidadosamente se raspou o conteúdo da placa com uma espátula. Os fragmentos miceliais mais grandes foram macerados, a suspensão ajustada para uma concentração de 10^8 UFC se filtrou com papel de filtro.

Em um Erlenmeyer contendo 135 ml de meio PDA a uma temperatura de aproximadamente 40%, se verteu 15 ml do filtrado da suspensão micelial do patógeno, a mistura se verteu em placas de Petri. Após a solidificação do medio de cultura misturado, se inoculou 10 µl da suspensão bacteriana no centro da placa respectivamente e com uma espátula de Drigalsky a gota foi espalhada uniformemente por toda a placa. Se usaram como variantes as cepas antagónicas (PF5, AI05 e AJ13) e *A. sonali* (160) com três repetições por variante. Como controles foram utilizadas placas de medio de cultura misturado e o outro controle com placas de PDA inoculadas com a suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a $30\pm 1^\circ\text{C}$ e no escuro. Se avaliou o número de colônias do patógeno às 72, 120 e 168 horas.

Ação preventiva contra cepas de *Pseudomonas* no crescimento de *A. solani*

Em placas de Petri contendo PDA, 10µl de cada uma das suspensões bacterianas foram inoculados separadamente no centro da placa e espalhados uniformemente com espátula de Drigalsky.

A suspensão micelial de *A. solani* foi obtida conforme descrito no experimento anterior. A suspensão micelial foi pulverizada assepticamente nas placas com crescimento bacteriano de 24 horas. Os controles foram placas de Petri com meio PDA que, após 24 horas, foram inoculadas com a suspensão micelial. Todas as placas foram incubadas a $30\pm 1^\circ\text{C}$. Cinco réplicas foram realizadas por variante. Se avaliou o número de colônias aos 72, 120 e 168 horas. As percentagens de inibição foram calculadas segundo a fórmula de Abbott (CIBA-GEIGY, 1981) e processados segundo o teste de comparação de proporções.

A seleção da(s) cepa(s) bacteriana(s) com maior atividade antagônica contra *A. solani* foi realizada com base nos resultados obtidos nos diferentes testes, sob os seguintes critérios:

- I. A cepa causa pelo menos 50% de inibição do crescimento do patógeno em relação ao controle.
- II. A cepa tem ação preventiva e fungistática, reduzindo em 60% o número de colônias do patógeno, em comparação ao controle.



Resultados e Discussão

Atividade antagônica de cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes contra *A. solani* em diferentes meios de cultura

As cepas de *Pseudomonas* spp. inibiram o crescimento de *A. solani* no meio de cultura NA, com diferenças significativas em relação aos controles, em todos os momentos de avaliação (Tabela 1). Também foi observado efeito inibitório no meio PDA, com exceção da cepa AJ13, cujo efeito apresentou diferenças significativas em relação aos controles apenas no sétimo dia de avaliação. Em ambos os meios de cultura, de maneira geral, a cepa *P. protegens* Pf-5 apresentou melhor desempenho quando comparada às outras duas cepas.

O meio PDA favoreceu o crescimento fúngico (Tabela 1). Guerra *et al.* (2011) observaram, em suas pesquisas, que o meio de cultura NA favoreceu o crescimento de *Pseudomonas*, já que no meio de cultura PDA o seu desenvolvimento foi mínimo. Similares resultados foram obtidos por Gupta *et al.* (2020) quem encontraram rápido crescimento de *Pseudomonas* no meio de cultura água agar com respeito ao meio PDA.

Tendo em consideração ambos os aspectos, infere-se que para selecionar a cepa bacteriana com maior efeito sobre o fungo fitopatogênico é mais adequado realizar os experimentos em meio PDA, para que o fungo seja favorecido em seu crescimento e que a bactéria, apesar de estar em condições não ótimas, demonstra seu potencial como agente de controle biológico, afirmação que coincide com o que relatado por Tekiner *et al.* (2019).

Tabela 1. Efeito inibitório da suspensão bacteriana de três cepas de *Pseudomonas* no crescimento micelial (mm) de *A. solani* em dois meios de cultura

Cepas bacterianas	Crescimento de patógeno (mm) em dois meios de cultura					
	Nutriente agar (NA)			Potato dextrose agar (PDA)		
	72 h	120 h	168 h	72 h	120 h	168 h
Pf-5	0,20 a	0,40 a	0,50 a	4,00 a	10,20 a	11,80 a
AJ13	2,80 b	9,60 c	12,40 c	8,60 b	18,20 b	23,80 c
AI05	0,50 a	5,40 b	9,20 b	4,40 a	11,80 a	21,40 b
Control NC	4,20 c	12,40 d	15,00 d	9,60 b	19,00 b	33,20 e
Control H ₂ O	4,80 c	13,80 e	16,60 e	9,40 b	18,40 b	31,00 d
ESx	0,40	1,01	1,17	0,52	0,79	1,56
CV	0,80	0,61	0,55	0,36	0,25	0,32

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey)

A cepa AI05 manteve diferenças significativas com o controle, embora sua atividade antagônica tenha diminuído na última avaliação. A cepa AJ13 apresentou diferenças significativas em relação aos controles apenas às 168 horas após a avaliação. De modo geral, a

cepa Pf-5 de *P. protegens* apresentou maior inibição quando comparada às outras duas cepas em todos os momentos de avaliação.

Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas fluorescens* no crescimento de *A. solani*

As suspensões bacterianas têm efeito fungistático no crescimento *A. solani* em comparação com o controlo, que por sua vez é significativamente maior que o efeito dos metabólitos (Tabela 2). Os metabólitos das cepas de *Pseudomonas* não apresentaram diferenças significativas entre si, em termos de efeito inibitório sobre o crescimento de *A. solani*. Apenas os metabólitos da cepa PF-5 apresentaram efeito inibitório com diferenças significativas em todos os momentos de avaliação em relação ao controlo, com exceção dos metabólitos da cepa AI-05 após às 72 horas de avaliação. Isto demonstra que o efeito inibitório dos metabolitos no crescimento de *A. solani* *in vitro* é inferior ao exercido pelas suspensões bacterianas.

Tabela 2. Efeito inibitório dos metabólitos e suspensões bacterianas das três cepas de *Pseudomonas* no crescimento micelial de *A. solani*

Cepas bacterianas	Inibição em mm		
	72 h	120 h	168 h
PF5-metabolitos	10,67 c	17,00 c	28,00 c
AJ-13- metabolitos	12,00 cd	20,00 cd	31,67 cd
AI-05- metabolitos	11,67 cd	19,67 cd	30,33 cd
PF5- SB	1,83 a	5,33 a	12,00 a
AJ-13- SB	5,33 b	10,67 b	23,33 b
AI-05- SB	3,33 ab	10,33 b	21,33 b
Controlo H ₂ O	14,33 e	23,67 e	33,00 d
ESx	0.95	1.32	1.43
C. V.	0.51	0.41	0.26

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey)

De forma geral os resultados obtidos neste trabalho demonstram que tanto a suspensão bacteriana como os metabolitos da cepa PF5 de *P. protegens* têm um efeito fungistático significativo sobre o crescimento de *A. solani* *in vitro* (Figuras 2 e 3).

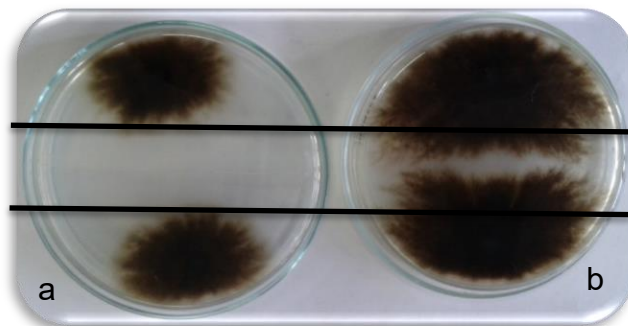


Figura 2. Efeito fungistático da cepa PF5 de *P. protegens* sobre o crescimento de *A. solani*. a. Interação suspensão bacteriana - patógeno. b. Controle.

P. fluorescens Pf-5 produz quatro metabólitos tóxicos para fungos e oomicetos, importantes no biocontrole: dois policetídeos pioluteorina e 2,4-diacetilfloroglucinol, triptofano clorado derivado da pirrolnitrina e cianeto de hidrogênio, que são formados pela oxidação da glicina (Álvarez-García *et al.*, 2020).

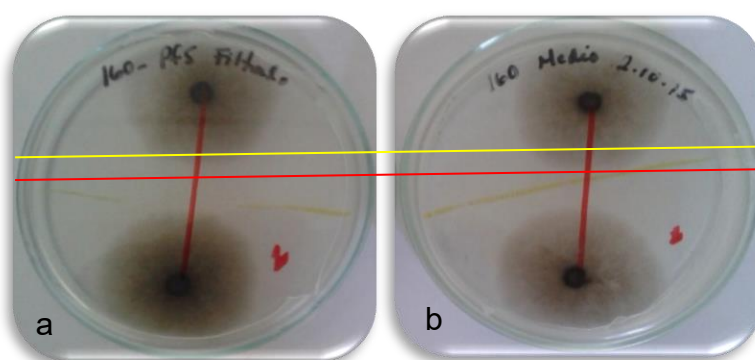


Figura 3. Efeito metabólico da cepa PF5 de *P. protegens* sobre o crescimento de *A. solani*. a. Interação filtrado da suspensão bacteriana - patógeno. b. Controle.

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com os resultados obtidos por Gupta *et al.* (2020) quem observaram no seu estúdio 73.6 % de inibição do crescimento de *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc frente a os 16 isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes.

Estes resultados não coincidem com os relatados por Hernández-Rodríguez *et al.* (2010) que demonstraram que quando os 17 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes, incluindo AI05 e AJ13, foram confrontados com um isolado de *Curvularia* sp., todos apresentaram efeito antagônico contra o fitopatógeno, enquanto contra *A. solani* seu antagonismo foi fraco. Também não concordam com os resultados obtidos por Izzeddin e Medina (2011), pois obtiveram inibição do crescimento de *Fusarium monilliforme* Sheldon e *Phytophthora* spp. em mais de 5 mm com metabólitos de cepas de *Pseudomonas* às 120 h; nem com os de Magesh *et al.* (2018) que obtiveram redução no crescimento de *A. solani* de 5,56 mm com a cepa Pf-5 às 360 h, enquanto no presente ensaio, às 72 e 168 h de avaliação, a inibição foi de 2,66 e 4,5 mm, respectivamente. É possível que essas diferenças sejam devidas às cepas de *Pseudomonas* e/ou

aos patógenos utilizados no ensaio, o que reafirma que a seleção de cepas como agentes de controle biológico é de grande importância.

Trabalhos recentes enfatizam a ação dos metabólitos dessas bactérias como antifúngicos (Fleitas e Gabrovski, 2014; Acebo-Guerrero *et al.*, 2015; Magesh *et al.*, 2018). No entanto, Majumder *et al.* (2014), Noriega-Toledo *et al.* (2016) e Tekiner *et al.* (2019) concordam que o sucesso de *Pseudomonas* como agente de controle biológico contra doenças fúngicas de plantas se deve aos seus mecanismos de ação como: a produção de diversos metabólitos antifúngicos que contribuem para a inibição do crescimento, a produção de sideróforos, a liberação de antibióticos, a produção de enzimas líticas, parasitismo, competição por nutrientes e espaço e indução de resistência (Advian *et al.*, 2023). Eles ressaltaram que essas bactérias não utilizam um único mecanismo, mas em alguns casos vários podem ocorrer simultaneamente ou em sucessão, o que garante o controle do fitopatógeno.

Efeito antagônico de cepas de *Pseudomonas* contra *A. solani* através difusão em meio de cultura

As suspensões bacterianas das três cepas de *Pseudomonas* apresentaram efeito inibitório sobre *A. solani*, mesmo sem contato com o patógeno. Os metabólitos produzidos pela cepa Pf-5 causaram a maior inibição do crescimento fúngico (Figura 4), com diferenças significativas em relação aos demais tratamentos. Embora os resultados obtidos com a cepa AJ13 tenham sido significativamente diferentes daqueles do controle a partir do quinto dia, a inibição mais baixa foi alcançada nesta cepa (Tabela 3).

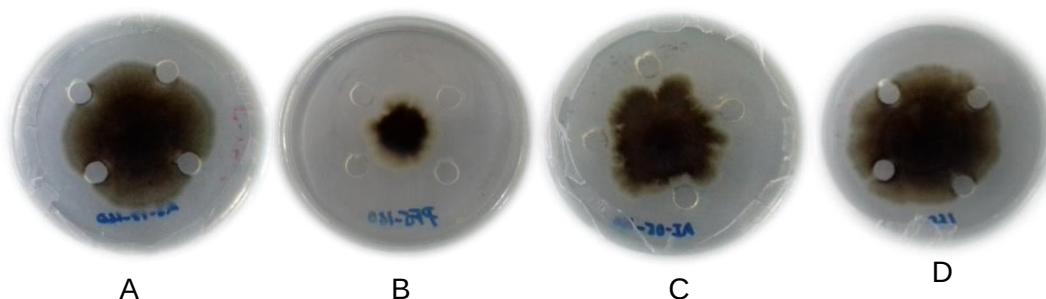


Figura 4. Efeito antagônico dos metabólitos de cepas de *Pseudomonas* contra *A. solani* às 168 horas. A: AJ13; B: Pf-5; C: AI05 e D: Controle

Tabla 3. Efecto inhibitorio de las suspensiones bacterianas de *Pseudomonas* sobre el crecimiento micelial (en mm) de *A. solani* (cepa No. 160)

Cepas	Diâmetro da colônia em mm		
	72 h	120 h	168 h
Pf-5	6,0 a	10,0 a	11,80 a
AJ13	11,20 c	18,40 c	23,80 c



AI05	9,40 b	14,20 b	21,40 b
Controlo H ₂ O	12,40 c	20,80 d	33,20 d
ESx	0,47	0,79	1,43
CV	0,26	0,27	0,35

Médias com letras diferentes, na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey)

Villamil *et al.* (2015) avaliaram a eficácia da atividade antagonista de microrganismos nativos isolados do solo e observaram que uma cepa de *P. fluorescens* reduziu o crescimento de *Moniliophthora roreri* Cif & Par. Além disso, documentaram que é possível que o mecanismo exercido pela bactéria seja a antibiose, devido à produção de metabólitos secundários voláteis ou difusíveis, mas que em qualquer caso, sem entrar em contato físico com o patógeno, estes podem inibir ou restringir sua crescimento.

Determinação de metabólitos inibidores de crescimento de *A. solani* por difusão no meio de cultura

Foi demonstrado que no espaço existente na placa, entre o patógeno e a cepa Pf-5, havia a presença de metabólitos difusos no meio de cultura, pois conseguiram reduzir o crescimento do patógeno no disco proveniente da referida área (Fig. 5). Na literatura consultada não foram encontrados antecedentes de análise dos modos de ação desta bactéria para o controle de *A. solani*.

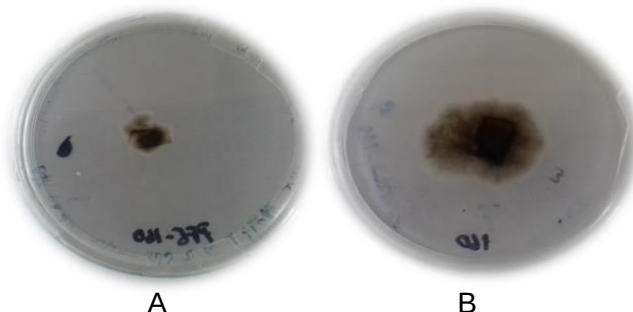


Figura 5. Efeito inibitório dos metabólitos da cepa Pf-5 contra *A. solani* às 168 horas. A. disco micelial do patógeno cultivado em fragmento de meio de cultura PDA com metabólitos da cepa. B. crescimento do patógeno em fragmento de meio de cultura PDA sem metabólitos (Controle).

A emissão de compostos voláteis é outro mecanismo que faz com que as cepas de *Pseudomonas fluorescens* tenham diferentes graus de antagonismo contra fungos fitopatogênicos.

Álvarez-García *et al.* (2020) apontaram que cepas de *Pseudomonas* spp. suprimem o desenvolvimento de patógenos e apresentam altos percentagens de inibição devido à sua capacidade de produzir metabólitos de natureza antibiótica, como pioluteorina, pirrolnitrina, ácido carboxílico 1-fenazina e 2,4 diadetilfloroglucinol. Os resultados deste experimento

corroboram com a confirmação destes autores, deveria se realizar pesquisas necessárias para identificar os metabólitos da cepa de *Pseudomonas protegens* envolvidas no antagonismo contra o patógeno em estudo.

Ação preventiva contra cepas de *Pseudomonas* no crescimento de *A. solani*

Todas as cepas de *Pseudomonas* em estudo inibiram as colônias do fungo fitopatogênico com diferenças significativas entre elas (Tabela 4). A cepa Pf-5 se destacou com mais de 70% de inibição, seguida pelas cepas AI05 e AJ13, que apresentaram o menor efeito inibitório em todos os tempos avaliados (Fig. 6). Esta atividade é um elemento importante que poderia ter implicação na epifitologia da doença no campo, pois pode-se inferir que poderia reduzir o número de lesões nas folhas e, assim, limitar o desenvolvimento da epífitia.

Este efeito das cepas bacterianas deve estar relacionado aos metabólitos tóxicos ao fungo, que elas excretam no meio, portanto o patógeno diminuiu o número de colônias em relação ao controle. Após 120 h, a atividade da cepa Pf-5 permaneceu constante, sendo seu efeito preventivo ainda maior ao longo do tempo. Embora as cepas AI05 e AJ13 apresentassem menos colônias que o controle, a porcentagem de colônias de *A. solani* nesses tratamentos continuou aumentando nas avaliações de 120 e 168 horas. É possível que o efeito inibitório da suspensão bacteriana diminua ao longo do tempo devido ao esgotamento de nutrientes no meio (Tabela 4).

Tabela 4 Ação preventiva de cepas de *Pseudomonas* no crescimento *A. solani*

Cepas bacterianas	*Porcentagem de inibição do número de colônias		
	72 h	120 h	168 h
Pf-5	74,61 a	74,23 a	79,51 a
AJ13	15,28 c	8,71 c	5,77 c
AI05	52,36 b	37,75 b	35,06 b
ESx	4,94	6,01	8,19

Médias com letras diferentes, na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey)

*Análise de proporções (Método Wald por correções)

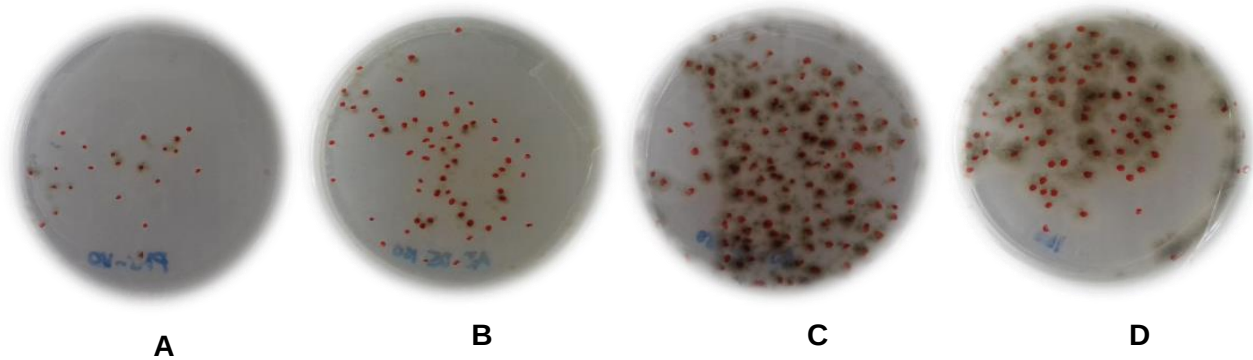


Figura 6. Ação preventiva de cepas de *Pseudomonas* no crescimento *A. solani* às 72 horas A: Pf-5; B: AI05; C: AJ13 e D: Controle.

Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas* no crescimento de *A. solani* (mistura do patógeno no meio de cultura)

As cepas de *Pseudomonas* inibiram o número de colônias de *A. solani* mesmo quando o patógeno foi misturado ao meio de cultura, em comparação ao controle. No entanto, houve diferenças nos resultados entre as cepas. O efeito fungistático mais evidente foi produzido pela ação da cepa Pf-5, com diferenças significativas em relação às demais cepas ao longo do ensaio (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas* contra *A. solani*.

Cepas bacterianas	*Percentagem de inibição do número de colônias		
	72 h	120 h	168 h
Pf-5	65,38 a	62,70 a	67,26 a
AJ13	19,91 c	13,27 b	11,50 c
AI05	40,50 b	21,74 b	27,08 b
ESx	4,10	3,92	5,49

Médias com letras diferentes, na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$, segundo teste de Tukey)

*Análise de proporções (Método Wald por correções)

A cepa Pf-5 apresentou alto percentagem de inibição de colônias de patógenos (superior a 60%), porém menor que na ação preventiva, o que mostra que existem alguns metabólitos que atuam nas colônias do fungo nos estágios iniciais de seu desenvolvimento. No entanto, esta hipótese precisa de demonstração.

Esta cepa de *P. protegens* também provoca alterações na intensidade da cor marrom das colônias de *A. solani*, que diminui, em comparação com as demais cepas e o controle (Fig. 7). Esta atenuação da cor torna-se mais visível às 168 horas, portanto este aspecto deve ser estudado posteriormente, a fim de esclarecer se existem danos fisiológicos causados pela bactéria no

fungo, e sua influência na sua patogenicidade, o que poderia reduzir a virulência do fitopatógeno e, portanto, o desenvolvimento da doença.

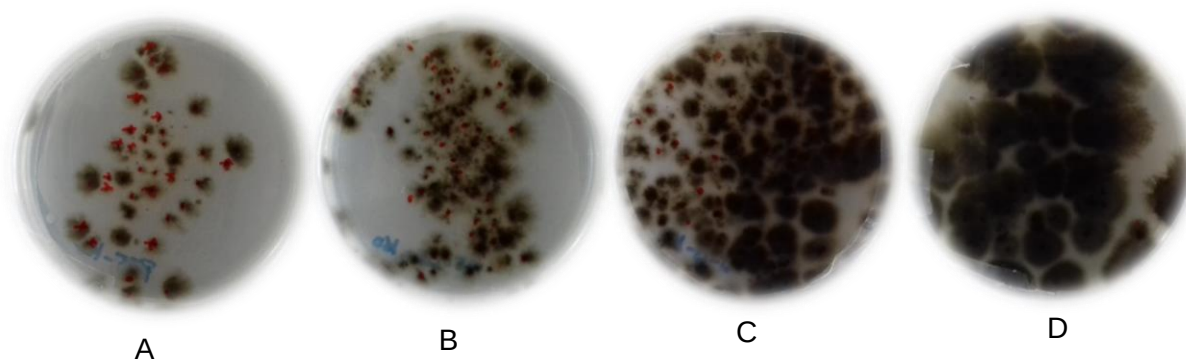


Figura 7. Efeito fungistático de cepas de *Pseudomonas* contra *A. solani* (mistura de patógenos no meio de cultura) às 168 horas. A: PF-5; B: AI05; C: AJ13 e D: Controle.

A diminuição do número de colônias do fungo nos ensaios preventivos e fungistáticos apresenta tendência semelhante aos resultados relatados por Santoyo *et al.* (2010) que encontraram maior inibição no tratamento ao inocular a cepa ZUM80 de *P. fluorescens* 24 h antes de *Colletotrichum lindemuthianum* Briosi & Cavaray, com 76% de inibição, em comparação às variantes de inoculação simultânea (30%) ou 24 horas depois (28%). Esses autores observaram padrão semelhante na ação preventiva da mesma cepa contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, pois quando inoculado 24 horas após a cepa bacteriana, seu crescimento foi inibido em até 72%. Tekiner *et al.* (2019) observaram na sua investigação uma taxa de 62,50% de inibição da cepa MF 3 de *P. fluorescens* contra *Alternari alternata*.

Segundo Santoyo *et al.* (2010), as altas percentagens de inibição detectados com a inoculação da cepa *P. fluorescens* ZUM80 24 horas antes dos patógenos podem ser devidos ao fato de que as bactérias precisam de tempo para sintetizar os metabólitos secundários que causam a inibição. Vários autores (Santoyo *et al.*, 2010; Fleitas e Grabowski, 2014; Quispe *et al.*, 2022) sugerem que *Pseudomonas* tem alto potencial como agente de controle biológico através da produção de sideróforos, mas requerem tempo para sintetizá-los.

Santoyo *et al.* (2010) descobriram que o crescimento do micélio de *Phytophthora cinnamomi* Rands foi inibido em até 70%, quando inoculado 24 horas após uma cepa de *P. fluorescens*, enquanto 24 horas antes a inibição foi completamente nula.

Os resultados apresentados neste trabalho coincidem com os obtidos por estes pesquisadores. As cepas utilizadas no presente trabalho apresentaram maior potencial como agentes de controle

biológico, pois conseguiram inibir o patógeno, tanto 24 horas antes quanto 24 horas após suas aplicações.

A ação antagonista demonstrada neste trabalho coincide com os resultados obtidos por Fleitas e Grabowski (2014) que conseguiram inibir 17,1% do crescimento de *Bipolaris* sp. 22,4% do de *Curvularia* sp. e 39,3% do *Exserohilum turcicum* K.J. Leonard & Suggs com cepas de *P. fluorescens*.

O método mais comum para controlar doenças nas culturas é a utilização de compostos químicos; no entanto, foi comprovado que estes têm consequências negativas para o ambiente e para a saúde humana (Majumder *et al.*, 2014). Dentre as novas alternativas para o manejo de doenças de culturas, a utilização de microrganismos com capacidade de restringir o crescimento de fitopatógenos torna-se uma opção viável.

Os principais mecanismos envolvidos no controle biológico de fitopatógenos com utilização de bactérias antagonistas são: competição por nutrientes, minerais e espaço; a síntese de metabólitos, como sideróforos, antibióticos, toxinas e biossurfactantes, e a indução de resistência sistêmica na planta (Acebo *et al.*, 2012; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Adviany *et al.*, 2023).

Segundo Plascência *et al.* (2012), um dos grupos de microrganismos avaliados como controladores de fitopatógenos, são bactérias antagonistas, dentre as quais se destacam as pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos através dos quais exercem atividade antagonista ou inibitória contra fungos e bactérias fitopatogênicas (Carrillo *et al.*, 2022).

Porém, embora seja reconhecido o efeito de bactérias da espécie *P. fluorescens* como agentes de controle biológico, este trabalho demonstra que existem diferenças na eficácia e nos mecanismos de ação entre os isolados. Daí a necessidade de realizar estudos que aprofundem as suas características, modos de ação e metabólitos, que sirvam de base para a seleção das cepas que se revelam mais promissoras.

São feitas contribuições ao conhecimento relacionado à versatilidade metabólica e plasticidade genética das cepas de *Pseudomonas* no antagonismo contra *A. solani* determinando a ação preventiva e fungicida da suspensão bacteriana, bem como o papel dos metabólitos no controle desse patógeno.

Ao analisar os resultados das cepas de *Pseudomonas* nos testes de antagonismo contra *A. solani* (Tabela 6), observa-se que a cepa que atende plenamente aos critérios de seleção propostos foi a Pf-5 de *P. protegens*, portanto a que foi considerada para os experimentos em condições de campo.

Na literatura consultada, são poucos os trabalhos que fazem análises abrangentes dos modos de ação dessa bactéria, como foi abordado no presente trabalho para o controle de *A. solani*.

Tabela 6. Seleção da cepa promissora de acordo com os critérios estabelecidos

Cepas de <i>Pseudomonas</i> spp	Inibição do crescimento do patógeno em comparação com o controle ($\geq 50\%$) às 168 horas	Diminuição do número de colônias do patógeno em 60%, em comparação ao controle		Diminuição do crescimento do patógeno devido à ação dos metabólitos excretados pelo antagonista	
		Preventiva	Fungistática	Discos embebidos	Difusível no medio de cultura
Pf-5	64,46	79,51	67,26	+	+
AI05	35,54	35,06	27,08	-	+
AJ13	28,31	5,77	11,50	-	+

Conclusões e Recomendações / Ideias Finais

1. As cepas de *Pseudomonas* apresentam variabilidade na sua capacidade antagônica contra *A. solani* em condições *in vitro*.
2. A cepa Pf-5 de *P. protegens* foi a mais promissor para o controle deste patógeno.
3. A cepa Pf-5 mostrou efeito inibitório, fungicida e fungistático sobre o controle de *A. solani*.
4. Contudo, outros estudos em escala de campo devem ser realizados para verificar os verdadeiros efeitos desta cepa no controle desta praga e no manejo para ser integrada ao manejo integrado da doença no cultivo da batata, aspecto que deve ser testado em condições de campo.

Referências Bibliográficas

1. Acuña, I.; Sandoval, C.; Sepúlveda, C. (2021). Enfermedades de la papa: Plataforma de evaluación de riesgo sanitario. INIA, Chile. <http://enfermedadespapa.inia.cl>.
2. Adviany, I; Alawiah, A; Azis, AM; Hasanudin, B; Wibiksana MW. (2023). Applications *Pseudomonas fluorescens* Migula. to Control the Intensity of Purple Spot (*Alternaria Porri* Ell. Cif.) In Red Onion (*Allium Ascalonicum* L.). Baltic Journal of Law & Politics 16:3, 2950-2962. ISSN 2029-0454.
3. Álvarez-García, J.A; Santoyo, G; Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 16(1):1-10. ISSN: 2448-878X.
4. Betancourth, CA; Sañudo, BA; Flórez CA; Salazar CE. (2022). Eficacia de biofungicidas para el manejo de la costra negra (*Rhizoctonia solani* Kühn) de la papa en Nariño, Colombia. Información Tecnológica 33(1), 279-288
5. Cang, T., Sun, C., Zhao, H., Tang, T., Zhang, C., Yu, R., Wang, X., Wang, Q., Dai, F., & Zhao, X. (2018). Residue behavior and risk assessment of imidacloprid applied on greenhouse-cultivated strawberries under different application conditions. Environmental Science and Pollution Research, 25, 5024–5032.
6. Carrillo RS; Ramírez GP. (2022). *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 13(4): 715-725.
7. Castillo Y, Miranda I. (2014). COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. Rev. Protección Veg. 29(3): 231-234
8. CIBA-GEIGY. (1981). Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Segunda edición revisada y ampliada. Editado y publicado por Werner Püntener, División Agricultura, CIBA-GEIGY S.A. Basilea, Suiza. 33-35.
9. Dias, A.S; Santos, C.C. (2022). Bactérias promotoras de crescimento de plantas: conceitos e potencial de uso. Pantanal Editora, Nova Xavantina, MT: Pantanal. ISBN 978-65-81460-63-1.
10. Faberi, AJ; Sanchez, MC; Ramirez, NP; Hansen M. (2022). Biocontrol de *Alternaria solani* y *A. alternata* en el cultivo de papa con *Trichoderma harzianum*. Revista Latinoamericana de la Papa. 26 (1): 4 – 16. ISSN: 1853-4961.
11. Fontes, EG; Valadares-Inglis MC. (2020). Controle biológico de pragas da agricultura. Editoras técnicas. – Brasília, DF: Embrapa. ISBN 978-65-86056-01-3
12. Fundora O, Llanes D, Eichler-Löbermann B, Lugo I, Mena L, Pérez A. (2010). Reducción de la fertilización nitrogenada en papa: menor incidencia de enfermedades, limitación de la contaminación ambiental y mayor rendimiento. Centro Agrícola. 37(1): 5-10.
13. Guimarães, VF; Klein, J; Klein, DK. (2021). Promoção de crescimento e solubilização de fosfato na cultura da soja: coinoculação de sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Pseudomonas fluorescens*. Research, Society and Development 10: 11, 1-27. ISSN 2525-3409.
14. Gupta, S; Didwania, N; Singh, D. (2020). Biological control of mustard blight caused by *Alternaria brassicae* using plant growth promoting bacteria. Current Plant Biology 23, 100166. ISSN 2214-6628.
15. Hernández-Mansilla A, Sorí-Gómez R, González-Alfonso D, López-Mayea A. (2017). Escenarios bioclimáticos para el tizón tardío [*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary] y tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer.) de la papa en Cuba. Revista Latinoamericana de la Papa. 21(1): 55 – 72.
16. Hernández-Rodríguez A, Plasencia L, Rives R, Díaz A, Almaguer C, Acebo Y. (2010). Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescentes* con actividad antagonista ante *Curvularia* spp. Rev. Protección Veg. 25 (3) 181-189. ISSN 2224-4697.
17. Hernández-Rodríguez A, Ruíz Y, Acebo Y, Miguélez Y, Heydrich M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. Rev. Protección Veg. 29 (1): 11-19. ISSN: 2224-4697.
18. Majumder D, Kongbrailatpam J, Suting E, Kangjam B, Lyngdoh D. (2014). *Pseudomonas fluorescens*: A potential biocontrol agent for management of fungal diseases of crop plants. Springer International Publishing AG, Part of Springer Science Business Media. Fungal Biology. 317-342. ISBN 978-1-4939-1188-2. DOI: 10.1007/978-1-4939-1188-2_11.
19. Martín R, Jeréz E. (2017). Efecto de las temperaturas en el rendimiento de la papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Romano. Cultivos Tropicales. 38(1): 75-80.
20. Ojeda-Quintana, L. J., Becerra Fonseca, E., López Melian, A., Quintana Salgado, E., & García Velázquez, S. (2020). Comportamiento de la papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad “Santana” en un suelo Pardo grisáceo de la Empresa Citríco Arimao, Cumanayagua, Cienfuegos. Revista Científica Agroecosistemas, 8(3), 115-121.

21. Quispe-Quispe, E., Moreira-Morillo, A. A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). Una revisión sobre biocontroladores de *Phytophthora capsici* y su impacto en plantas de *Capsicum*: Una perspectiva desde el exterior al interior de la planta. *Scientia Agropecuaria*, 13(3), 275-289.
22. Saccsa. Peligros de los fungicidas. (2015). <http://www.gruposacsa.com.mx/1015-2/>
23. Santos-Torres, M., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Gutiérrez, A., Vargas, C., Castro, E., Caro-Quintero, A., Uribevélez, D., & Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. *Rhizosphere*, 17, 1–9, e100290
24. Silva UC; Cuadros-Orellana S; Silva DRC; Freitas-Júnior LF; Fernandes AC; Leite LR; Oliveira CA; Dos Santos VL (2021). Genomic and Phenotypic Insights Into the Potential of Rock Phosphate Solubilizing Bacteria to Promote Millet Growth in vivo. *Front. Microbiol.* 11:574550. doi: 10.3389/fmicb.2020.574550.
25. Tekiner, S., Kotan, R., Tozlu, E. and Dadaşoğlu, F. (2019). Determination of Some Biological Control Agents Against *Alternaria* Fruit Rot in Quince. *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*, 34(1): 25-31. doi: 10.28955/alinterizbd.578541.
26. Villamil E, Viteri E, Villegas W. (2015). Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 68(1): 7441- 7450.
27. Yesid A, Sánchez L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 10(18): 135–250.