XXVIII Encontro Anual de Iniciação Científica
V Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2019

EFEITO DE FUNGICIDA, INSETICIDA E INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO TRIGO

Willian Yuiti Takahashi (PROVIC), Rafael Mazer Etto, Salomé Urrea-Valencia, Daniel Potma Gonçalves, Laís Priscila Karas, Eduardo Fávero Caires, Carolina Weigert Galvão (Orientadora), e-mail: carolinawgalvão@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM

Ciências Biológicas, Bioquímica

Palavras-chave: qPCR, Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, agroquímicos, tratamento de sementes.

Resumo

O uso de *Azospirillum brasilense* como inoculante é crescente nos últimos anos. Entretanto, pouco se conhece a respeito da compatibilidade entre a bactéria e os agroquímicos utilizados nos tratamentos das sementes. Diante deste contexto, foi avaliado o efeito do tratamento de sementes na habilidade de *Azospirillum brasilense* FP2 de promover o crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), além disso, o DNA das bactérias inoculadas foi quantificado por qPCR. O presente estudo demostrou que a habilidade para promover o crescimento das plantas de trigo e o número de bactérias de *A. brasilense* FP2 descaíram devido aos tratamentos químicos, de valores na ordem de 10^8 UFC g^{-1} de raiz nos tratamentos sem adição de agroquímicos ou com protetor celular, para valores na ordem de 10^3 UFC g^{-1} de raiz quando não foi adicionado protetor celular. Recomenda-se que para garantir o efeito da promoção do crescimento de plantas por *A. brasilense* FP2 no trigo, a semeadura deve ser realizada dentro das quatro primeiras horas após a inoculação e em associação com uso de protetor celular com os tratamentos químicos, caso a semeadura seja realizada após este período.

Introdução

O gênero *Azospirillum* sp. tem sido um dos mais estudados gêneros de BPCV nos últimos 40 anos. No Brasil, todos os inoculantes baseados em *Azospirillum* sp. são formulados com a espécie *Azospirillum brasilense* e usado principalmente em cereais. Embora a inoculação com *Azospirillum brasilense* tenha se mostrado uma tecnologia promissora (DÍAZ-ZORITA; FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009; HUNGRIA *et al.*, 2010), limitações relacionadas com a compatibilidade entre o inoculante e os químicos utilizados nos tratamentos de sementes são esperadas. Entretanto, pouco se sabe a respeito do efeito dos agroquímicos sobre a viabilidade do *Azospirillum brasilense*, pelo fato da inoculação em gramíneas ser uma técnica recente e pouco difundida quando comparado com a inoculação de leguminosas por exemplo.

Diante da escassez de estudos relacionados com o efeito de fungicida/inseticida e a utilização de protetores celulares sobre a viabilidade e eficiência de *Azospirillum brasilense* FP2 na cultura do trigo, o seguinte projeto foi desenvolvido.

Material e Métodos

Experimento em casa de vegetação: O experimento foi implantado em delineamento inteiramente aleatorizado com arranjo fatorial 5 (tratamentos de sementes) x 4 (níveis de inoculação) e 4 repetições. Os cinco tratamentos de sementes (TS) testados foram: T1- inseticida (Imidacloprido + tiodicarbe), T2-

fungicida (triadimenol), T3- inseticida + fungicida, T4- inseticida + fungicida + protetor celular GRAP EXTRA NOD® e T5- controle sem tratamento químico. E os quatro níveis de inoculação testados foram: não inoculado, semeado no momento da inoculação, semeado 4 h após a inoculação e semeado 24 h após a inoculação. As sementes foram tratadas e em seguida foram inoculadas com *A. brasilense* FP2 numa concentração de 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) ml^{-1}. Vinte e oito dias após a semeadura, 10 plantas por vaso foram coletadas por inteiro e foram mensurados o comprimento e a massa secadas raízes e da parte aérea.

Coleta e preparo de amostras para análise por qPCR: foram coletadas dez plantas inteiras nos dias 7; 14 e 21 após a semeadura. Foi extraído o DNA das raízes utilizando-se o kit PowerPlant® DNA Isolation (MoBio Laboratories). A quantificação de *A. brasilense* FP2 foi realizada utilizando-se os *primers* Azo-2 (STETS *et al.,*2015). O programa de qPCR utilizado foi de 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação de 3 passos (95 °C por 15'', 60 °C por 20'' e 72 °C por 20''), incluindo uma curva de desnaturação seguindo-se os parâmetros automáticos do equipamento. A curva de calibração foi construída a partir do DNA extraído, produto da diluição seriada da bactéria (10^8-10^2 UFC ml^{-1}).

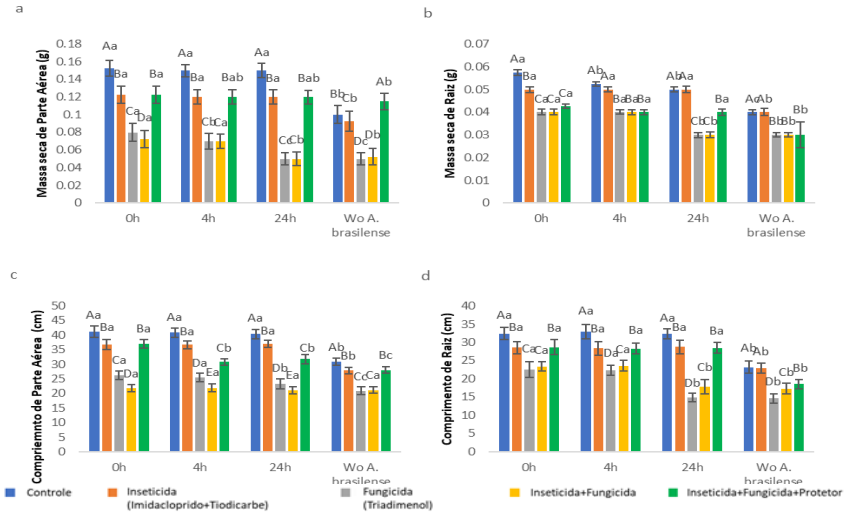
Análise estatística: Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p<0,05$), usando linguagem R (Versão Windows 3.5.1), e o pacote estatístico ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). Os parâmetros biométricos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) na matriz de correlação, em linguagem R (R Core Team, 2017), utilizando o pacote Vegan (OKSANEN *et al*., 2011).

Resultados e Discussão

O fungicida (triadimenol) promoveu decréscimo de todos os parâmetros avaliados, concordando com Buchenauer e Roner (1981), Silva *et al*. (1993) e Rampim *et al*. (2012). Por outro lado, o inseticida (imidacloprido+tiodicarbe) não influenciou a massa seca e comprimento do sistema radicular, mas influenciou negativamente os parâmetros da parte aérea. A adição do protetor celular no tratamento de semente induziu o desenvolvimento de biomassa da parte aérea em comparação com o controle. Embora a função do protetor seja reduzir o efeito tóxico dos agroquímicos, o protetor se comportou também como um agente "seed priming" (MCDONALD, 1999), efeito que é reconhecido por criar condições ideais para a inoculação bacteriana e colonização de sementes (MCQUILKEN; RHODES; HALMER, 1998).

O inseticida diminuiu em 40-60% o potencial da bactéria *A. brasilense* FP2 de induzir o desenvolvimento radicular (comprimento e massa seca, respectivamente) e em 20-40% do potencial de induzir desenvolvimento de parte aérea (comprimento e massa seca, respectivamente) (Figura 1). Da mesma forma, foi observado que o fungicida reduziu 20% e 50% da promoção de desenvolvimento de raiz e parte aérea pela inoculação, nesta ordem (Figuras 1c,d). Quando aplicados em conjunto, o fungicida e inseticida, diminuíram ainda mais a capacidade de promover o desenvolvimento da parte aérea (90%), mas para massa da raiz foi equivalente ao controle e para o comprimento de raiz equivalente aos químicos de modo isolado (Figura 1). Referente aos tempos de semeadura após inoculação, foi verificado que quanto maior o tempo mais deletério são os efeitos dos agroquímicos nos parâmetros avaliados, sendo que apenas no tratamento com adição de protetor celular o impacto foi menor inclusive 24 h após inoculação (Figura 1).

Figura 1 – Avaliação do efeito da semeadura postergada (4 ou 24 horas) na capacidade de *A. brasilense* FP2 promover crescimento do trigo.



Os seguintes parâmetros biométricos do trigo cultivado em casa de vegetação foram avaliados: massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), comprimento da parte aérea (c) e comprimento de raiz (d). Legenda: Letras maiúsculas diferentes nas colunas de mesmo tempo de avaliação indicam diferença estatística entre os tratamentos de sementes de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes nas colunas de mesmo tratamento indicam diferença estatística entre os tempos de avaliação de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). Os resultados são medias de 4 replicatas (vasos) de 10 plantas cada, totalizando 40 plantas/tratamento.

O impacto do tratamento de sementes com agroquímicos também foi verificado pelo número de bactérias quantificadas por qPCR, sendo que os únicos tratamentos nos quais foi possível quantificar *A. brasilense* FP2 nas raízes do trigo, foram aqueles que não receberam tratamento de sementes (10^8 UFC g^{-1}) ou que o tratamento de sementes foi acompanhado de protetor celular (10^7 UFC g^{-1}), nos tratamentos restantes não foi possível quantificar *A. brasilense* FP2 devido a que as bactérias encontravam-se abaixo do limite de detecção (10^3 UFC g^{-1}).

Conclusões

O tratamento químico de sementes, principalmente fungicidas do grupo dos triazóis, reduzem a viabilidade bacteriana e a adição do protetor celular proporciona um aumento considerável na sobrevivência de células de *A. brasilense* FP2 previamente inoculadas.

É recomendável a semeadura dentro das quatro primeiras horas após a inoculação ou o uso de protetor celular em associação com o tratamento de sementes, caso a semeadura seja realizada após as quatro primeiras horas pós inoculação.

A inoculação de *A. brasilense* FP2 e o tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas mostraram ser tecnologias que podem estar empregadas em conjunto, entretanto cuidados devem ser tomados a fim de usufruir dos benefícios de ambos insumos.

Os tratamentos que apresentaram melhor desempenho no teste em casa de vegetação foram os que mais apresentaram DNA de *Azospirillum brasilense* FP2, mostrando uma correlação entre quantidade de DNA nas raízes e biomassa das plantas.

Agradecimentos

Às agências de fomento: INCT/Fixação Biológica de Nitrogênio; CNPq/MCT, CAPES e Fundação Araucária; à toda equipe do LABMOM,à Sementes Mauá e Agrocete.

Referências

BUCHENAUER, H.; RÖHNER, E.. Effect of triadimefon and triadimenol on growth of various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism in shoots of barley seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 15, n. 1, p.58-70, fev. 1981. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/0048-3575(81)90034-1.

CÁCERES, Enrique A. Rodríguez. Improved Medium for Isolation of Azospirillum spp. **Applied And Environmental Microbiology**v. 4, n. 44, p.990-991, nov. 1982.

Couillerot, O., Bouffaud, M., Baudoin, E., Muller, D., Caballero-mellado, J., Moënne-loccoz, Y., 2010. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry** 42, 2298–2305. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.003

DÍAZ-ZORITA, Martín; FERNÁNDEZ-CANIGIA, María Virginia. Field performance of a liquid formulation of Azospirillum brasilense on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p.3-11, jan. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.07.001.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs pacakge. R package version 1.1.2. 2013.

HUNGRIA, Mariangela et al. Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p.413-425, 13 jan. 2010.

MCDONALD, M B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 27, p.177-237, jan. 1999.

MCQUILKEN, M P; HALMER, P; RHODES, D J. Application of microorganisms to seeds. In: DORDRECHT, Burges (Ed.). **Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments.** [s.i]: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 255-285.

NAGHILI, Hossein et al. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Vet Res Forum**, v. 3, n. 4, p.179-183, jan. 2013.

OKSANEN, J et al. Vegan: Community Ecology Package. Reference manual. R package version 2.0-5. 2012. Disponível em http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf.

PEDROSA, Fábio Oliveira; YATES, M G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasilense by nifA and ntr (gln) type gene products. **Fems Microbiol Lett**, v. 23, n. 1, p.95-101, jun. 1984.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

RAMPIM, Leandro et al. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p.678-685, 2012. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222012000400020.

SILVA, RogÉrio T.v. et al. EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES E DA PROFUNDIDADE DE SEMEADURA NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE AVEIA-BRANCA (Avena sativa L.) E A MICROFLORA DA RIZOSFERA E DO RIZOPLANO. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p.303-311, jan. 2002.

STETS, Maria Isabel et al. Quantification of Azospirillum brasilense FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 81, n. 19, p.6700-6709, 17 jul. 2015. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.01351-15.