

Inoculação de bactérias *Azospirillum brasiliense* em milho e seu efeito sobre *Spodoptera frugiperda* e seus inimigos naturais

Carlos Alexandre de Lara^{1*}, Ana Karolina Pelegrini¹, João Ronaldo Freitas de Oliveira¹, Diego de Paula¹, Cristiane Nardi¹

RESUMO

Em milho é comum a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente *Azospirillum brasiliense*, que comprovadamente aumentam a estrutura e a produtividade das plantas. Além de favorecer o desenvolvimento, há registros de que a interação com essas bactérias ativam rotas de defesas nas plantas, induzindo as defesas diretas e indiretas contra herbívoros. Neste estudo, avaliou-se a presença e os danos ocasionados por *Spodoptera frugiperda* em milho com ou sem inoculação com *A. brasiliensis*, buscando investigar se a interação gerou resposta direta de defesa, interferindo nos danos de herbivoria. Além disso, caracterizou-se a população de inimigos naturais associados, a fim de avaliar a indução de defesas indiretas na planta. Para analisar os danos em campo, foram avaliadas folhas não expandidas da cultura utilizado a escala de Davis e Willians nos estádios V2-V5. Em laboratório, avaliou-se a presença de inimigos naturais das lagartas coletadas em campo. As injúrias ocasionadas por lagartas em campo não diferiram entre plantas inoculadas e não inoculadas. A frequência de inimigos naturais não foi influenciada pela inoculação do milho. Dessa forma, a inoculação das raízes de milho com *A. brasiliense* não foi efetiva em termos de defesas diretas e indiretas de milho em relação à *S. frugiperda*.

Palavras-chave: defesa indireta, inimigos naturais, inoculante agrícola

INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo, pois é a matéria prima para produção de diversos alimentos processados, além de ser uma das principais fontes de proteínas utilizadas para a nutrição animal (CONAB, 2019). Esta cultura necessita de diversos nutrientes para completar seu ciclo, principalmente o nitrogênio (N), sendo que para se produzir 9,20 t de grãos por hectare, a cultura do milho absorve um total de 185 kg por hectare de N (COELHO, 2006). Para auxiliar a absorção do nitrogênio, é comum a inoculação das plantas com *Azospirillum brasiliense*, uma bactéria que quebra a tripla ligação entre dois átomos de N, transformando-o em amônia e tornando-o livre para a absorção da planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Um fator limitante para o desenvolvimento da cultura é a população de *Spodoptera frugiperda*, uma lagarta desfolhadora conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, que causam perdas significativas à produção (CRUZ, 1995). Dentre os fatores que interferem na intensidade do dano de *S. frugiperda* estão os mecanismos de defesa das plantas, que podem ser físicos ou químicos, e atuar de forma direta e indireta contra as lagartas (DICKE & van POECKE, 2002; TURLINGS et al., 1990; SCHOONHOVEN et al. 2005). As defesas químicas podem ser constitutivas ou induzidas, quando ocorrem fatores externos bióticos ou abióticos que ativam a emissão de compostos que repelem herbívoros ou atraem inimigos naturais de tais pragas. Em laboratório, tem-se demonstrado que a interação de plantas e rizobactérias induz as defesas das plantas, as quais passam a emitir compostos químicos que agem diretamente ou indiretamente contra os herbívoros (PINEDA et al., 2017). Pineda et al., 2017 destacam que os microrganismos de solo promovem benefícios diretos nas plantas e interferem nas interações com insetos na parte aérea. Em milho,

¹Laboratório de Entomologia Agrícola, Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. *Email: carlos.alexandredelara98@gmail.com

Santos et al. (2014) demonstraram que a interação com *A. brasiliense* resultou na indução das defesas, sendo que plantas inoculadas com rizobactéria emitiram β -cariofileno pelas raízes, uma substância associada com a atração de nematóides entomopatogênicos. Apesar de diversos trabalhos terem demonstrado esses processos em laboratório, poucos apresentam dados sobre ensaios de campo, permanecendo desconhecidos os efeitos dessas interações em ambientes mais complexos.

Neste trabalho, o objetivo foi testar a hipótese de que a associação de milho com a rizobactéria *A. brasiliense* em campo afeta a intensidade de injúrias de *S. frugiperda* nas plantas, e também incrementa a ação dos inimigos naturais dos herbívoros associados às plantas no ambiente agrícola.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em área experimental de um hectare, dividido em quatro blocos de 100m² com parcelas de 25m², localizado na FAZESC - UNICENTRO/IAPAR, em Guarapuava-PR (25°23'19"S; 51°32'58"W, altitude 1.0002m). O experimento foi realizado no período de agosto de 2018 a julho de 2019. Em cada bloco, foram cultivadas plantas de milho submetidas aos seguintes tratamentos: inoculação com *A. brasiliense*; sem inoculação.

Para as avaliações de injúria foliar foram realizadas observações semanais, aos 15, 21, 28 e 35 dias após plantio, inspecionando 40 plantas de milho, ao acaso, por tratamento. Foram consideradas apenas as folhas não expandidas do milho (“cartucho”), para evitar a superestimação das injúrias. A avaliação foi realizada em quatro pontos amostrais, considerando cinco plantas da mesma fileira de cultivo para cada ponto, em aproximadamente um metro na linha. As notas foram atribuídas de acordo com a escala de Davis & Williams (1989).

As avaliações dos inimigos naturais de *S. frugiperda* nos tratamentos ocorreram semanalmente, com a coleta das lagartas presentes na parcela avaliada. Todas as lagartas encontradas foram quantificadas e dispostas em placas de Petri que foram forrada com papel filtro umedecido, onde passaram a ser alimentadas com folhas de milho convencional. O material permaneceu em câmaras climatizadas do tipo BOD (25 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 14h) até a emergência do adulto ou de parasitoides. Os parasitoides emergidos foram acondicionados em tubos de ensaio plástico, contendo de álcool 70%, e posteriormente identificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação de milho com *A. brasiliense* não influenciou a intensidade de injúrias ocasionadas por *S. frugiperda* às plantas. Os níveis de danos de *S. frugiperda* em milho inoculado ou não inoculado com *A. brasiliense* foram similares na maioria das avaliações, variando apenas na segunda avaliação, quando o milho encontrava-se em estágio V3 (Tabela 1).

Inimigos naturais de *S. frugiperda* foram evidenciados em todas as amostras coletadas, independente do tratamento (Tabela 2). Dentre os inimigos naturais presentes no campo, foram encontrados três gêneros de parasitoides, sendo *Chelonus* sp. Cresson (Hymenoptera: Braconidae), *Campoletis* sp. (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e um Tachinidae cujo gênero não foi identificado, parasitando um total de 18,41% das lagartas ao longo do ciclo da cultura. Entretanto, não se observou diferença no percentual de parasitismo das lagartas coletadas nos tratamentos, indicando que além da inoculação em milho não ter influenciado as defesas diretas das plantas, possivelmente não afetou as defesas indiretas.

Tabela 1. Notas Médias de danos (mínimo e máximo) ocasionados por *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasiliense* e não inoculadas. Guarapuava PR, 2019.

Tratamentos	Avaliação 1 Data 28-11	Avaliação 2 Data 05/12	Avaliação 3 Data 12/12	Avaliação 4 Data 19/12	Média
-------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	-------

<i>A. brasiliense</i>	1,85 (1-4) a*	3,10 (1-5) b	6,23 (4-9) a	7,10 (4-9) a	4,58 (1-4,5) a
Sem inoculação	1,95 (1-5) a	4,58 (2-7) a	6,18 (4-9) a	6,38 (4-9) a	4,77 (4-9) a

* Letras iguais na coluna indicam diferenças não significativas entre os tratamentos (Mann Whitney, GL=39, p<0,05%).

Tabela 2. Porcentagem de *Spodoptera frugiperda* parasitadas coletadas em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. Guarapuava PR, 2019.

Tratamentos	Avaliação 1 Data 05/12	Avaliação 2 Data 12/12	Avaliação 3 Data 19/12	Média
<i>A. brasiliense</i>	45,0	25,0	0	12,0 a
Sem inoculação	10,0	21,0	1	9,0 a

Letras iguais na coluna indicam diferenças não significativas entre os tratamentos (Mann Whitney, GL=1, p=0,051).

As rizobactérias são capazes de incrementar o potencial de defesas de plantas (FUKAMI et al., 2018), como é o caso de algumas variedades de milho que produzem maior quantidade do composto volátil β -cariofileno a partir rizofagia por *D. speciosa* (SANTOS et al. 2014). Tais compostos podem ser responsáveis pelas defesas indiretas, atraindo inimigos naturais dos herbívoros e resultando na redução das injúrias sofridas pela planta (DICKE et al., 1998). No presente trabalho, entretanto, não foram encontradas evidências da ação da inoculação com rizobactérias nas defesas de milho em relação a *S. frugiperda*. Dessa forma, nas condições em que o ensaio foi realizado, a inoculação com a rizobactéria não teve ação de redução de danos por *S. frugiperda*. O fato deste ensaio ser realizado em condições de campo pode ter influenciado a resposta das plantas ou dos insetos. A ausência de efeito sobre os herbívoros pode estar relacionada a não ativação das rotas de defesa na planta, bem como à ausência de respostas dos insetos (*S. frugiperda* e seus inimigos naturais) aos mecanismos de defesa das plantas. Assim, permanece incerto se a interação *A. brasiliense* e o híbrido de milho utilizado resultou, de fato, na ativação das rotas metabólicas de defesa da planta contra o inseto. Isso porque, há casos em que mesmo sendo ativado, o arsenal de defesas da planta não é capaz de atuar direta ou indiretamente sobre determinada população de herbívoros (MOISAN et al., 2020). Entre os fatores que afetam essas respostas, está a característica genética da planta utilizada. Considerando que a variedade ou híbrido da planta avaliada pode influenciar a capacidade de defesa das plantas, novos estudos podem desvendar o efeito de tais interações em ambientes agrícolas.

CONCLUSÃO

A inoculação em milho com *Azospirillum brasiliense* não influenciou o comportamento da *S. frugiperda* em relação a intensidade de danos ocasionados no milho cultivado em campo, tampouco o número de parasitoides coletados nas lagartas, indicando que a interação de *A. brasiliense* e milho não foi efetiva nas defesas direta e indireta das plantas contra o inseto.

AGRADECIMENTOS:

À Fundação araucária, pela bolsa de Iniciação Científica no primeiro autor. Esta pesquisa foi financiada pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Semioquímicos na Agricultura

(FAPESP e CNPq #2014/50871-0 e #465511/2014-7, respectivamente). Agradecimentos à Fundação Araucária pela bolsa do acadêmico Carlos Alexandre de Lara.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB -. Perspectivas para a agropecuária, v. 6 - Safra 2018/19, 2019. Disponível também em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso 14/02/2022.

COELHO, A.M. Nutrição e Adubação do Milho. Sete Lagoas: Editoração Eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa, 2006. 10 p.

CRUZ, Ivan. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1995.

DAVIS, F. M.; WILLIAMS, W. P. Methods used to screen maize for and to determine mechanisms of resistance to the southwestern corn borer and fall armyworm. In: International Symposium On Methodologies For Developing Host Plant Resistance To Maize Insect, 1989, México. Proceedings... México: [s.n.], 1989. p. 101-108.

DICKE, M.; VAN POECKE, R.M.P. Signalling in plant-insect interactions: signal transduction in direct and indirect plant defence. *Plant signal transduction*, v. 289, p. 316, 2002.

DICKE, M.; TAKABAYASHI, J.; POSTHUMUS, M.A.; SCHUTTE, C.; KRIPS, O.E. Plant-phytoseiid interactions mediated by prey-induced plant volatiles: variation in production of cues and variation in responses of predatory mites. *Experimental & Applied Acarology*, v.22, n.6, p.311-333, 1998.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: Editora Ufla, p. 449-465, 2006.

MOISAN, K.; LUCAS-BARBOSA, D.; VILLELA, A.; GREENBERG, L.O.; CORDOVEZ, V.; RAAIJMAKERS, J.M.; DICKE, M. No evidence of modulation of indirect plant resistance of Brassica rapa plants by volatiles from soil - borne fungi. *Ecological entomology*, 2020.

SANTOS, F.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; PARÉ, P.; SANCHES, P.A.; KAMIYA, A.; TONELLI, M.; NARDI, C.; BENTO, J.M.S. A novel interaction between plant-beneficial rhizobacteria and roots: colonization induces corn resistance against the root herbivore *Diabrotica speciosa*. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113280, 2014.

SCHOONHOVEN, L. M. et al. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand, 2005.

PINEDA, A.; KAPLAN, I.; BEZEMER, T. M.. Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. **Trends in plant science**, v. 22, n. 9, p. 770-778, 2017.

TURLINGS, T.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, v. 250, n. 4985, p. 1251-1253, 1990.