

NOTAS CIENTÍFICAS

BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO MASSAL DE ACTINOMICETOS ANTAGONISTAS A *RALSTONIA* *SOLANACEARUM*, EM TOMATEIRO¹

ANDRÉA BITTENCOURT MOURA², REGINALDO DA SILVA ROMEIRO³
e MARIA CRISTINA PRATA NEVES⁴

RESUMO - O potencial antagonístico de 190 isolados de actinomicetos, obtidos de diferentes solos, da rizosfera, do rizoplano e de tecidos internos de plantas sadias (endófitas), foi avaliado contra *Ralstonia solanacearum*. Sementes de tomate foram tratadas com suspensão de propágulos destes actinomicetos em agitação por dez minutos, e postas a germinar em solo naturalmente infestado por *R. solanacearum* em condições controladas por 45 dias, avaliando-se controle da murcha. Dezoito isolados proporcionaram 100% de controle. Foram comparados os métodos de aplicação: por imersão de sementes, imersão de raízes nuas, e imersão de sementes com posterior imersão de raízes. A forma mais eficiente de aplicação, considerando porcentagem de controle, em relação à maioria dos tratamentos, foi a imersão de sementes na suspensão de propágulos.

BIOASSAY FOR MASSAL ASSESSING OF ANTAGONISTIC ACTINOMYCETES AGAINST *RALSTONIA SOLANACEARUM* ON TOMATO CROP

ABSTRACT - The antagonistic potential of 190 actinomycetes isolated from rhizosphere, rhizoplane and root tissue (endophytics) of tomato was assessed against *Ralstonia solanacearum*. Tomato seeds were treated with propagules suspension of these actinomycetes in agitation for ten minutes and then, sowed in *R. solanacearum* naturally infested soil. The plants were grown at 28°C for 45 days, for wilting control, and the percentage of infected plants was recorded. Eighteen actinomycetes showed 100% of control. The best way of inoculation of the antagonists, such as in seeds, in roots or seeds and root soaking was evaluated. The most efficient way of application (control percentage) was by dipping the seeds in a propagules suspension of actinomycetes.

A murcha-bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* é uma das mais sérias doenças do tomateiro, que ocorre em todo o território nacional (Lopes & Quezado-Soares, 1997). A bactéria apresenta uma longa sobrevi-

¹ Aceito para publicação em 30 de junho de 1998.

² Eng^a Agr^a, D.Sc., Prof^a Adjunto, Dep. de Fitossanidade, FAEM, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: abmoura@ufpel.tche.br

³ Eng. Agr., Ph.D., Prof. Titular, Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: rromeiro@mail.ufv.br

⁴ Eng^a Agr^a, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), CEP 23851-970 Soropédica, RJ. E-mail: mcpneves@cnpas.embrapa.br

vência no solo e na rizosfera de plantas daninhas ou de outros hospedeiros alternativos (Granada & Sequeira, 1983). A variabilidade genética de *R. solanacearum* tem possibilitado adaptação (Hayward, 1991). O controle da murcha-bacteriana tem-se restringido à adoção de medidas preventivas e culturais (Lopes & Santos, 1994). O controle biológico através de antagonistas tem possibilitado solução viável para várias doenças consideradas de difícil controle.

Os actinomicetos compreendem um grupo de procariotas naturalmente habitantes dos solos, que se adaptam a diversas condições de ambiente (Goodfellow & Williams, 1983). No solo produzem antibióticos (Korn-Wendisch & Kützner, 1992) e são capazes de colonizar rizosfera (Miller et al., 1989) e tecidos internos das plantas (Sardi et al., 1992). Trabalhos visando ao controle da murcha pelos actinomicetos datam de 1935 (Hino, citado por Thornton & Skinner, 1953). Mais recentemente, obtiveram-se bons resultados no controle de *R. solanacearum* em batata-doce, banana e tomate, utilizando diferentes espécies de *Streptomyces* (Gao et al., 1983; El-Abyad et al., 1993a, 1993b).

O controle biológico parte de uma seleção *in vitro* de microorganismos com potencial antagonista contra determinados patógenos (Baker & Cook, 1974). A seleção *in vitro* possibilita avaliar uma população elevada, além de ser um método prático, rápido, que permite padronizações. Por outro lado geralmente não há correlação significativa entre antagonismo demonstrável em cultura e efetividade em condições de campo (Andrews, 1985). A seleção *in vivo*, ainda que seja um processo demorado e com maior exigência de espaço e material, tem sido considerado como essencial para chegar ao controle em condições de campo (Mariano, 1993). Neste ponto, surge uma decisão difícil: ou se trabalha com poucos candidatos, mas em uma condição bem próxima à do cultivo do hospedeiro, ou se utiliza uma grande população de microorganismos em condições artificiais bem diferentes das encontradas em condições de campo. Qualquer que seja a opção do pesquisador, implicações em perdas – seja no tempo gasto em uma seleção em que seus resultados podem não se corresponder quando realizada *in vivo* –, seja pelo pequeno universo explorado, diminuindo as possibilidades de se encontrar um controlador altamente efetivo, como na primeira opção.

Neste trabalho, objetivou-se a seleção massal, em câmara de crescimento, de actinomicetos isolados de solos, de rizosfera, de rizoplano e de tecidos internos de tomateiro com potencial para o controle de *R. solanacearum*, e verificar a melhor forma de aplicar o potencial antagonista.

Cultivo e manutenção dos microorganismos

Os actinomicetos utilizados foram isolados de solo, da rizosfera e do rizoplano, pelos métodos de diluição em placas-de-Petri, e de espalhamento de solo em meio de extrato de solo (Pramer & Schmidt, 1964). Foram adicionados ao meio cicloheximida e nistatina na concentração final de 100 ppm (Williams & Davies, 1965) e de fenol a 0,7% (Lawrence, 1956), com e sem pré-tratamento térmico, e também de tecidos internos de tomateiros sadios, por deposição, no mesmo meio, de secção transversal de raiz, externamente esterilizada. To-

dos os isolados de actinomicetos foram preservados por repicagem tubo a tubo (Williams & Wellington, 1982).

O isolado de *R. solanacearum* foi obtido segundo Klement et al. (1990).

Condições do ensaio

As plantas de tomateiro foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C e observadas diariamente. Para avaliação dos resultados, foram feitos testes de exsudação em gotas (Lelliot & Stead, 1987) em todas as plantas com sintomas típicos. Ao final de 45 dias, as plantas que ainda não haviam manifestado qualquer tipo de sintoma foram avaliadas, para verificar a presença da bactéria, observando-se, ao microscópio, presença ou não, de exsudação bacteriana. Os resultados foram expressos em número de plantas não infectadas por tratamento.

Avaliação do potencial de antagonismo

Sementes foram imersas em suspensão salina (NaCl 0,85%) de propágulos de actinomicetos $OD_{540}=0,20$, obtida a partir de meio sólido, por 10 minutos, e colocadas para germinar em pequenos copos de plástico contendo 10 g de solo naturalmente infestado por *R. solanacearum*.

Em cada isolado de actinomiceto foram depositadas cinco sementes. Como testemunha, sementes foram imersas em água. Não foram feitas repetições.

Nos tratamentos em que ao final do período avaliado não surgiram plantas infectadas, procedeu-se a uma nova semeadura, com sementes não-tratadas, para verificação da presença de um nível populacional de *R. solanacearum* capaz de causar infecção.

Avaliação da melhor forma de aplicação dos actinomicetos

Solo tratado com brometo de metila foi infestado com *R. solanacearum*, por encharcamento, utilizando-se suspensão bacteriana com 10^9 CFU/mL, na proporção de 0,5 mL/g de solo.

Nesta triagem, foram utilizados todos os isolados de actinomicetos que na avaliação do potencial apresentaram alto potencial de controle, bem como alguns de baixo controle, para comparações, num total de 26 isolados.

Esta avaliação foi feita em três modalidades de tratamento: imersão de sementes; imersão de raízes; imersão de sementes com posterior imersão de raízes (Kerr, 1980). Utilizou-se uma semente ou uma planta por recipiente contendo 30 g de solo infestado artificialmente, em oito repetições, sendo cada parcela constituída de uma planta. Como testemunha, imergiram-se as sementes e, ou, raízes em água.

O isolado de *R. solanacearum* utilizado foi obtido e mantido sob óleo mineral, em solo esterilizado e emulsificado em glicerina (Klement et al., 1990).

Dos 190 actinomicetos utilizados na avaliação do potencial antagonístico, 18 isolados resultaram em 100% de controle, 34 em uma planta doente, 44 em duas plantas doentes, 43 em três plantas doentes, 24 em quatro plantas doentes, e 23, inclusive a testemunha, em cinco plantas doentes.

Em todos os tratamentos onde um segundo semeio foi necessário, surgiram plantas doentes numa proporção que variou de 10 a 80%, o que comprova

que existia um nível de inóculo mínimo para causar infecção (Goodman et al., 1986).

Os actinomicetos utilizados nesta avaliação podem ser considerados como de alto potencial antagonístico, uma vez que 10% deles proporcionaram 100% de controle, e outros 20% propiciaram 80% de controle da enfermidade. A porcentagem de controle também é satisfatória, pois, além de não existir controle efetivo para esta doença, resultados de pesquisas com controle *in vivo* costumam apresentar índices inferiores ou similares a esses, como o alcançado pelo isolado Nongkang 321 de *Streptomyces* em condições de campo em batata-doce, controlando *R. solanacearum* ao nível de 70 a 80% (Gao et al., 1983), e por *Streptomyces pulcher* e *Streptomyces citreofluorescens*, variando de 42,9 a 100% de controle para *R. solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomate (El-Abyad et al., 1993a).

Os tratamentos por imersão de órgãos vegetais, embora tenham apresentado bons resultados, como no controle de *Colletotrichum falcatum* (Sharma & Sinha, 1982) em tolete de cana-de-açúcar, e por imersão de raízes de tomateiro em suspensão de *Streptomyces ochraceiscleroticus* no controle de *Fusarium oxysporum* (Turhan, 1981) resultaram em alta porcentagem de infecção dos tomateiros por *R. solanacearum*. A imersão de raízes pode ter ocasionado ferimentos, abrindo caminho para entrada do patógeno; apesar de *R. solanacearum* não necessitar de ferimentos para penetrar e causar infecção (Vaughan, 1944), os ferimentos aumentam em muito a ocorrência da doença (Buddenhagen & Kelman, 1964). Há também a possibilidade de que outros pontos tenham interferido, como a não-aderência e a colonização pelos actinomicetos, dentre outros.

A superioridade da aplicação por sementes está claramente mostrada na Fig. 1. Esses resultados estão em conformidade com os obtidos no controle de *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicicola* (Kundu & Nandi, 1984; Tavonen, 1985; Tahvonen & Avikainen, 1987) e também com os dados encontrados no controle de *R. solanacearum* em tomate, em que a melhor forma de aplicação foi a cobertura de semente com esporos (El-Abyad et al., 1993a).

Talvez a cobertura de sementes seja uma forma melhor de aplicar o antagonista, já que, assim, um número maior de propágulos é carregado (El-Abyad et al., 1993a). A aplicação de microrganismos ao solo ou às sementes pode induzir proteção contra microrganismos deletérios e patogênicos (Tuzun & Kloepper, 1995). O tratamento das sementes e seu plantio em solo esterilizado pode ter acarretado o surgimento de resistência induzida, pois o período de tempo decorrido entre o contato da planta com o antagonista e a inoculação do patógeno foi o suficiente para que, caso tenha ocorrido a indução, a resistência se manifestasse. Porém, não se pode excluir outras possibilidades uma vez que o patógeno e o controlador não estavam separados espacialmente (Liu et al., 1995).

A necessidade de se desenvolverem metodologias mais próximas das condições naturais que testes *in vitro*, que permitam avaliar populações de microrganismos de forma massal e em pequeno intervalo de tempo, atualmente é o ponto de estrangulamento de muitos programas de controle biológico. Alguns pesquisadores, visando minimizar este problema, usaram com sucesso

órgãos destacados, como folhas de *Kalanchoe tubiflora* para avaliação do potencial de controle de procariontes diante de *Agrobacterium tumefaciens* (Napoleão, 1996).

Os testes de seleção *in vivo* usados neste trabalho permitiram avaliar grande número de microorganismos em curto intervalo de tempo, utilizando-se a planta inteira do hospedeiro cultivado em solo natural, embora as condições climáticas ainda fossem controladas. Dessa forma, reduziram-se etapas, como, por exemplo, a seleção em laboratório e em casa de vegetação; porém, cabe ressaltar que esse tipo de teste não pode ser tomado como definitivo, e que outras etapas de um programa de controle, como é o caso das avaliações de campo, necessitam ser cumpridas.

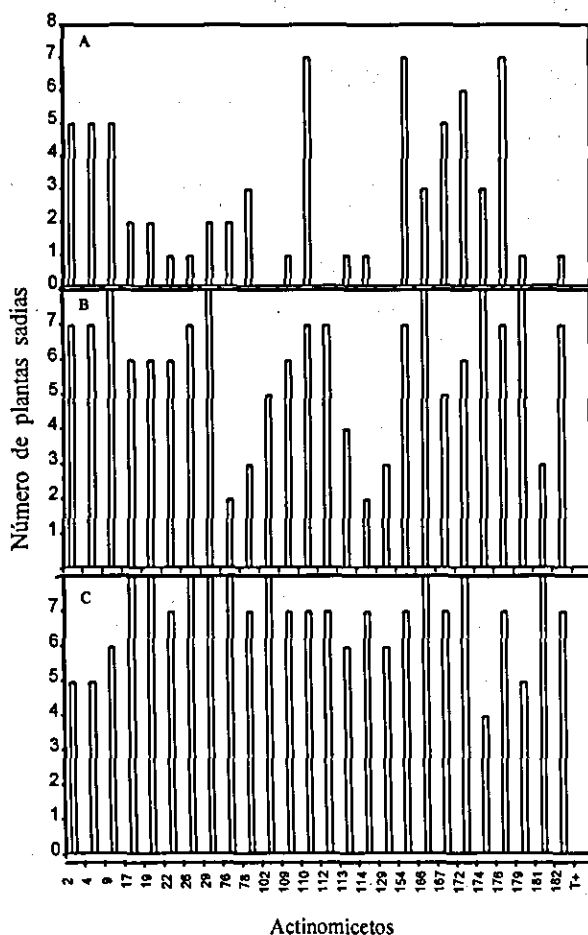


FIG. 1. Número de plantas sadias após tratamento de raízes (A), raízes e sementes (B) e sementes (C) com 26 actinomicetos, em solo naturalmente infestado por *Ralstonia solanacearum*.

Os resultados do presente trabalho permitem considerar os isolados de actinomicetos com alto potencial para o controle de *R. solanacearum* em tomateiro, principalmente quando veiculados às sementes.

Estudos posteriores, em condições de campo, fazem-se necessários, para verificar o comportamento destes actinomicetos em condições de cultivo, bem como avaliar a concentração de inóculo e sobrevivência do antagonista.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WIINDELS, C.F.; LINDOW, S.E. (Eds.). **Biological control on the phylloplane**. Saint Paul: APS Press, 1985. p.31-45.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: FREEMAN, 1974. 433p.
- BUDDENHAGEN, I.W.; KELMAN, A. Biological and physical aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.2, p.203-213, 1964.
- EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; EL-SHANSHOURY, A.R.; EL-BATANOUNY, N.H. Inhibitory effects of UV mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. **Canadian Journal of Botany**, v.71, p.1080-1086, 1993a.
- EL-ABYAD, M.; EL-SAYED, M.A.; EL-SHANSHOURY, A.R.; EL-SABBAGH, S.M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, p.185-95, 1993b.
- GAO, C.X.; LIN, C.Z.; FANG, S.M. Screening of the actinomycetes str. Nongkang 321 and assessment of its inhibitory effect on potato blast. **Fujian Agricultural Science and Technology**, v.4, p.33-35, 1983.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v.37, p.189-216, 1983.
- GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: Univ. of Missouri Press, 1986. 433p.
- GRANADA, G.A.; SEQUEIRA, L. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil rhizosphere and plant roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, n.4, p.433-440, 1983.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p.65-87, 1991.
- KERR, A. Biological control of crown gall through bacteriocin production. **Plant Disease**, v.64, n.1, p.24-30, 1980.
- KLEMENT, Z.; RULDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Eds.). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.
- KORN-WENDISCH, F.; KÜTZNER, H.J. The family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; SCHULEIFER, K.H. (Eds.). **The prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.921-995.

- KUNDU, P.K.; NANDI, B. Control of cauliflower damping-off using antagonist coated seeds. *Pedobiologia*, v.27, p.43-48, 1984.
- LAWRENCE, C.H. A method of isolation of Actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canadian Journal of Botany*, v.34, p.44-47, 1956.
- LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods of diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 216p.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.; TUZUN, S. Induction of systemics resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, v.85, n.6, p.695-698, 1995.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças-Diagnose e controle**. Brasília: Embrapa, 1997. 70p.
- LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa, 1994. 67p.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.1, p.369-409, 1993.
- MILLER, H.J.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Variation and composition of bacterial populations in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, v.35, p.656-660, 1989.
- NAPOLEÃO, R.L. **Avaliação de antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens* isolados de rizosfera, rizoplano e tumores de roseiras infectadas**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1996. 50p. Tese de Mestrado.
- PRAMER, D.; SCHMIDT, E.L. **Experimental soil microbiology**. Minnesota: Burgess Pub. Company, 1964. 107p.
- SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; ORGONOV, G.E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strain from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.8, p.2691-2693, 1992.
- SHARMA, D.D.; SINHA, S.K. Biological control of red-rot of sugarcane by *Streptomyces dayalbaghensis*. *Indian Phytopathology*, v.35, p.174-175, 1982.
- TAHVONEN, R. Mycostop - a biological formulation for control of fungal diseases. *Växtskyddsnotiser*, v.49, n.3, p.86-90, 1985.
- TAHVONEN, R.; AVIKAINEN, H. The biological control of seed-borne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with powdery preparation of *Streptomyces* sp. *Journal of Agricultural Science in Finland*, v.59, n.5, p.199-208, 1987.
- THORNTON, H.G.; SKINNER, F.A. The interaction of actinomycetes with other micro-organisms in soil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MICROBIOLOGY, 4., 1953, Roma. **Symposium - Actinomycetales: morfology, biology and systematics**. Roma: [s.n.], 1953. p.174-190.
- TURHAN, G. A new race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens. II. In vivo studies on the possibilities of using c/2-9 against some important diseases. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz*, v.88, p.422-434, 1981.

- TUZUN, S.; KLOEPPER, J. Practical application and implementation of induced resistance. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KÚC, J. (Eds.). **Induced resistance to disease in plants**. Dordrecht: Kúwer Academic, 1995. p.152-168.
- VAUGHAN, E.K. Bacterial wilt of tomato caused by *Phytopomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v.34, n.5, p.443-458, 1944.
- WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. **Journal General Microbiology**, v.38, p.251-261, 1965.
- WILLIAMS, S.T.; WELLINGTON, E.M.H. Actinomycetes. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Eds.). **Methods of soil analysis**. 2.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1982. p.969-987.