

Mecanismos de Ação de Rizobactérias do Feijão-Caupi Seleccionadas para Redução da Viabilidade de Escleródios de *Rhizoctonia solani*. Kátia de Lima Nechet¹; Isabel Santos Diniz²; Stefanny Araújo Martins²; Giovanni Ribeiro de Souza²; Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira¹.

¹Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340 Km 127,5, Jaguariúna, São Paulo; ² Universidade Federal de Roraima, Centro de Ciências Agrárias, Br 174 Km 12, 69300-000, Boa Vista, Roraima. E-mail: nechet@cnpmembrapa.br; isabelsd_rr@hotmail.com; sta.martins@hotmail.com; giovanni@cpafrr.embrapa.br; halfeld@cnpmembrapa.br.

RESUMO

O uso de rizobactérias vem sendo investigado para o controle da mela, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* AG1 IA, do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Estudos prévios permitiram a pré-seleção de oito isolados de rizobactérias do feijão-caupi com capacidade de inibir a germinação de escleródios de *R. solani in vivo* entre 33 e 96%. O objetivo deste trabalho foi identificar os mecanismos de ação relacionados à secreção de antibióticos, enzimas que degradam a parede celular e a competição por espaço e nutrientes destes isolados. Os ensaios foram realizados em condições controladas em placas de Petri no qual cada isolado foi testado diretamente para a produção de antibiose por difusão em meio, quitinase, glucanase e sideróforos. Cinco isolados foram positivos para antibiose por difusão em meio e dois isolados para glucanase. O isolado C12 foi positivo para ambos os parâmetros.

Palavras-Chave: *Vigna unguiculata*, quitinase, glucanase, sideróforos, antibiose.

ABSTRACT

Modes of action of cowpea rhizobacteria isolates selected for their ability to reduce sclerotia germination of *Rhizoctonia solani*.

The control of cowpea (*Vigna unguiculata*) web blight, caused by the fungus *Rhizoctonia solani* AG1 IA, has been investigated with rhizobacteria isolates. In previous screening eight rhizobacteria from cowpea were selected for their ability to reduce between 33 and 96% the *R. solani* sclerotia germination in greenhouse assay. The aim of this work was to identify the modes of action related to secretion of antibiotics and cell-wall degrading enzymes and competition for space and nutrients of these selected isolates. The assays were performed in control conditions on Petri dishes in which each isolate was tested directly for the production of antibiotics by media-diffusion, chitinases, glucanases and siderophore. Five rhizobacteria isolates were identified as positive for antibiosis and two for production of glucanase. The C12 isolate was positive to both parameters.

Key-Words: *Vigna unguiculata*, chitinases, glucanases, siderophores, antibiosis.

INTRODUÇÃO

A mela do feijão-caupi, causada pelo fungo de solo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk], é uma das principais doenças da cultura na região norte do país (Nechet et al., 2009). Métodos alternativos vêm sendo investigados para o controle da doença, entre eles o uso de rizobactérias visando interferir na sobrevivência e colonização de escleródios de *R. solani* no solo e conseqüentemente reduzir a densidade de inóculo da doença. Um ou mais mecanismos de ação podem estar envolvidos no controle de fitopatógenos por rizobactérias, dentre eles, destacam-se a secreção de antibióticos e enzimas que degradam a parede celular e a competição por espaço e nutrientes (Whipps, 2001). O objetivo desse trabalho foi identificar os mecanismos de ação relacionados à secreção de antibióticos, enzimas que degradam a parede celular e a competição por espaço e nutrientes de oito isolados de rizobactérias do feijão-caupi selecionados previamente por reduzirem a viabilidade *in vivo* de escleródios de *R. solani*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de rizobactérias do feijão-caupi utilizados foram selecionados por apresentarem índice de inibição da germinação (IIG) de escleródios de *R. solani* entre 33 e 96% em ensaio realizado anteriormente em casa-de-vegetação.

Para detecção da produção de quitinase foi utilizado o meio mineral Renwick contendo quitina coloidal a 0,08%. Após o semeio dos isolados, as placas foram mantidas em incubadora por 10 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A presença do halo transparente ao redor das colônias indicou resultado positivo. Para detecção da produção de glucanase foi utilizado o meio mineral Renwick contendo como única fonte de carbono 0,5% de laminarina. Após o semeio dos isolados, as placas foram mantidas em incubadora a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por seis dias. Após esse período, foi adicionada às placas 20 mL de uma solução de 0,5% de vermelho Congo, que permaneceu por 90 minutos. Resultado positivo para a produção de β -1,3-glucanase foi evidenciada pela observação de um halo translúcido de cor vermelho-laranja ao redor da colônia.

Para detecção de sideróforos, os isolados foram semeados em meio líquido B de King e mantidos por 48 horas sob contínua agitação. Como controle, os mesmos isolados foram cultivados no mesmo meio acrescido de 2 μ M de Fe^{2+} .mL⁻¹ a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, esterilizado por filtração. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos e o precipitado descartado. 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado 1 mL da solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS). A mudança de coloração de violeta-azulado para amarelo-avermelhado, em um período de até 15 minutos foi considerada como resultado positivo (Macagnan, 2005).

Para detecção de antibiose por difusão em meio, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970). Em cada placa foram distribuídas radialmente cinco

rizobactérias e utilizadas três repetições, sendo cada repetição uma placa. Depois de mantidas em incubadora tipo BOD a 26 °C por 24 horas, as células bacterianas foram mortas com a adição de 2 ml de clorofórmio na tampa da placa de Petri por quatro horas. Após esse período foi distribuída uma segunda camada de meio de Batata-Dextrose-Ágar e após solidificação do meio foi depositado, no centro de cada placa, um disco de micélio de *R. solani* AG1-1A. Após quatro dias, avaliou-se a presença ou não de halo de inibição do crescimento da colônia fúngica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mecanismos de ação identificados para os oito isolados de rizobactérias do feijão-caupi pré-selecionados por reduzir a viabilidade da germinação de escleródios de *R. solani* são apresentados na Tabela 1. Dos oito isolados de rizobactérias investigados, apenas dois (C34, C153) foram negativos para os parâmetros avaliados. Nenhum dos isolados testados foi identificado como produtor de quitinase ou sideróforos. A antibiose por difusão em meio foi o mecanismo mais frequente, identificado em cinco dos oito isolados testados (C41, C12, C131, C111 e C65). A produção de glucanase foi observada para dois isolados (C61 e C12).

Dentre os isolados testados, apenas C12 apresentou resultado positivo para dois mecanismos de ação, antibiose por difusão em meio e produção de glucanase (Tabela 1). Esse isolado apresentou IIG em torno de 70% *in vivo*. Os isolados que apresentaram IIG acima de 90%, C61 e C41, foram positivos para glucanase e antibiose, respectivamente. Os demais isolados positivos para antibiose apresentaram IIG variando de 44 a 93%, o que pode estar relacionado à quantidade o tipo de metabólito produzido por um isolado que tem efeito supressivo diferenciado contra *R. solani* como demonstrado na literatura (Szcech & Shoda, 2004).

A atividade antifúngica dos isolados C34 e C153, não identificada neste trabalho, pode estar relacionada a outros mecanismos de ação, como proteases e celulasas, e deve ser investigada em futuros experimentos.

Este trabalho resultou na identificação da antibiose e da glucanase como os mecanismos de ação de seis isolados de rizobactérias do feijão-caupi. Ambos os mecanismos são reconhecidos como importantes para suprimir fitopatógenos e a identificação de mais de um modo de ação permite combinar isolados com o objetivo de se alcançar um nível de controle maior.

LITERATURA CITADA

MACAGNAN D. 2005. *Isolamento e seleção de rizobactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (Crinipellis perniciososa) e da podridão parda (Phytophthora spp.) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo Crinipellis*

perniciosa. Viçosa: UFV. 113p. (Tese Doutorado).

NECHET KL; HALFELD-VIEIRA BA; BOARI AJ; NASCIMENTO JF. 2009. Doenças. In: ZILLI JE; VILARINHO AA; ALVES JMA (eds.) *A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira*. Boa Vista: Embrapa Roraima. p. 245-270.

SZCECH M; SHODA M. 2004. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 152: 549-556.

WHIPPS JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.

Tabela 1. Resultados dos ensaios de antibiose por difusão em meio, glucanase, sideróforos e quitinase para oito isolados de rizobactérias do feijão-caupi pré-selecionados por reduzirem a viabilidade de escleródios de *R. solani in vivo*. Boa Vista, Embrapa Roraima, 2010. Assays results for antibiosis by media-diffusion, glucanases, siderophore and chitinases for eight cowpea rhizobacteria isolates previously selected for their ability to reduce the sclerotia viability of *R. solani*. Boa Vista, Embrapa Roraima, 2010.

Isolado	Índice de inibição de germinação (%)	Antibiose por difusão em meio*	Glucanase*	Sideróforo*	Quitinase*
C61	96	-	+	-	-
C41	93	+	-	-	-
C12	71	+	+	-	-
C131	70	+	-	-	-
C111	55	+	-	-	-
C65	44	+	-	-	-
C34	41	-	-	-	-
C153	33	-	-	-	-

*+ representa produção; - representa não produção

*+ represents production; - represents no production

Área de Afinidade: Fitopatologia

Agente/meio de biocontrole: *Rhizoctonia solani*

Espécie do hospedeiro (se for o caso): *Vigna unguiculata*

Nome comum do hospedeiro (se for o caso): Feijão-caupi