

Rizobactérias para o biocontrole de *Radopholus similis*.

Celma Cardoso Peixoto¹; Aldo Vilar Trindade²; Harllen Sandro Alves Silva²; Kaliane Sírío Araújo³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Depto. de Fitossanidade, 50810-020, Recife, PE, celma_22@yahoo.com.br; ²Embrapa Mandioca e Fruticultura, 44380-000, Cruz das Almas, BA, aldo@cnpmf.embrapa.br, harllen@cnpmf.embrapa.br; ³Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, BA, kaliasesirio@hotmail.com.

RESUMO

Radopholus similis provoca perdas econômicas na cultura da bananeira. Há relatos que rizobactérias são capazes de produzir metabólitos nematicidas. Este trabalho objetivou isolar rizobactérias de diferentes espécies de plantas, avaliá-las quanto ao potencial de biocontrole de *R. similis* *in vitro* e *in vivo* e identificar os isolados mais promissores. Rizobactérias foram isoladas da rizosfera de cultivares de bananeira e de espécies nematicidas nos meios TSA e King B. Posteriormente, realizou-se a seleção pela quantificação do número de nematoides mortos após 24 e 36 h em contato com os metabólitos produzidos pelas rizobactérias. Os isolados de melhor desempenho foram submetidos à identificação em nível de gênero por PCR com primers para os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Dentre 152 isolados, 23 apresentaram toxidez a *R. similis* após 24 e 36 h. Cinco rizobactérias reduziram a população de *R. similis* no solo, em casa de vegetação. Dos 10 submetidos à identificação, três corresponderam ao gênero *Bacillus* e dois a *Pseudomonas*. As bactérias avaliadas apresentam potencial de antagonismo a *R. similis*.

Palavras chave: Banana, nematoide cavernícola, *Pseudomonas*, *Bacillus*

ABSTRACT: Rhizobacterial for the biocontrol of *Radopholus similis*.

Radopholus similis present economic importance to banana. Researches show that rhizobacteria produce nematicidal metabolites. This work aimed isolate rhizobacteria from different species of plants, evaluate them as for the potential biocontrol of *R. similis* *in vitro* and *in vivo* and to identify the isolates more promising. Rhizobacteria were isolated of the rhizosphere of the banana cultivars and nematicidal species on medium TSA and King B. After this, was determined the number of dead nematodes after 24 and 36 h in contact with the metabolites produced by rhizobacteria. The isolates with best performance were submitted to identification at the genus level by PCR with primers for the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*. Were obtained 152 strains, and 23 showed toxicity to *R. similis* after 24 and 36 h. Five had deleterious effect on the population of *R.*

similis in the soil at *in vivo* assay. Of the 10 submitted to identification three corresponded to the *Bacillus* and two to the *Pseudomonas*. The bacteria evaluated have potential against *R. similis*.

Keywords: Rhizospheric bacteria, burrowing nematode, *Pseudomonas*, *Bacillus*

INTRODUÇÃO

A bananeira é afetada pela ocorrência do nematóide *Radopholus similis* sendo este considerado o de maior importância para a cultura. Rizobactérias colonizam o sistema radicular das plantas, atuando de forma benéfica, especialmente isolados dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* que são amplamente conhecidos pela capacidade de atuarem no biocontrole de fitopatógenos, dentre esses, nematóides. Isso se deve à produção direta de compostos tóxicos, alteração dos exsudatos radiculares ou indução de resistência na planta hospedeira. Este trabalho teve como objetivos isolar rizobactérias de diferentes espécies de plantas, avaliá-las quanto ao potencial de biocontrole do *R. similis* por meio de testes *in vitro* e *in vivo* e identificar os isolados mais promissores em nível de gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento dos microrganismos foram utilizadas amostras de raízes de bananeira (Prata Comum e Prata Anã) e de duas espécies de plantas antagonistas a nematoides (Crotalária e Tagetes). Adotou-se a técnica da diluição seriada e os meios de cultura Tryptic Soy Agar e King B-agar. Os isolados obtidos foram preservados em meio NBY contendo 15 % de glicerina sendo posteriormente armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a obtenção das rizobactérias procedeu-se à extração dos metabólitos em meio líquido Tryptic Soy Broth e às avaliações *in vitro*. Para os testes foram utilizados 150 μL do extrato bacteriano contendo metabólitos e 50 μL de uma suspensão aquosa com 10 nematóides; ambos foram colocados em frascos, seguido de incubação em BOD a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quantificou-se o número de nematoides mortos após 24 e 36 h, com o auxílio do microscópio.

Isolados de melhor desempenho foram selecionados para ensaio com bananeiras da cultivar Grand Naine. As mudas tiveram suas raízes imersas em 50 mL de uma suspensão aquosa das rizobactérias ajustada para $\text{OD}_{540} = 0,5$ (10^9 ufc mL^{-1}), por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se o transplântio para tubetes contendo substrato autoclavado. Decorridos 45 dias as mudas foram transferidas para vasos contendo 2,0 kg de solo autoclavado e após 10 dias realizou-se a inoculação com *R. similis*. Avaliou-se também o nível de dano nas raízes e a quantificação do número de nematoides das raízes e do solo. Mudas não tratadas compuseram o controle. Os dados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SAS.

Foram submetidos à técnica de PCR os mesmos isolados do ensaio anterior, com a extração do DNA bacteriano por meio da repicagem dos isolados para microtubos contendo 200 µL de tampão de extração (0,05 M NaOH, 0,25 % SDS), seguido de tratamento térmico (20 min. a 100 °C), centrifugação (1 min. a 10.000 rpm) e coleta do sobrenadante contendo o DNA. Em seguida, foram realizadas as reações de PCR com primers específicos para os gêneros *Pseudomonas* (PSM_G e 9-27) e *Bacillus* (B-K1/F e B-K1/R). Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 %, fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados. A análise foi realizada pela presença de banda específica para cada gênero bacteriano: *Pseudomonas* sp. (445 pb) e *Bacillus* (1114 pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 152 isolados, sendo 77 em meio King B e 75 em TSA. Nos testes preliminares as diferenças significativas entre os tratamentos começaram a ocorrer a partir de 24 h de exposição dos nematoides aos metabólitos, sendo novamente observadas após 36 h. Depois de 42 h, 100 % dos espécimes que estavam na presença de metabólitos bacterianos se encontravam mortos. Naves et al. (2004) detectaram aumento da mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em todos os filtrados bacterianos testados quando se aumentou o período de exposição de 24 para 48 h. Resultados semelhantes foram observados neste estudo em que o aumento do período de exposição de juvenis e adultos e de *R. similis* a metabólitos bacterianos proporcionou acréscimo no percentual de nematoides mortos. Dos 152 isolados, 23 apresentaram efeito tóxico ao nematoide após 24 e 36 h estatisticamente significativo (Tabela 1). A maioria das rizobactérias (9 isolados) que se destacou nas avaliações foi oriunda de bananeira da cultivar Prata Anã. Existe, portanto, a possibilidade da microbiota rizosférica estar relacionada à característica de moderada resistência natural apresentada pela cultivar Prata Anã a *R. similis* (EMBRAPA, 2009), o que explicaria os resultados encontrados. No experimento em casa de vegetação não foram observadas diferenças estatísticas no nível de dano nas raízes e número de nematoides no sistema radicular. Porém, observou-se uma redução na população final de *R. similis* no solo, sendo que metade dos tratamentos diferiu da testemunha (Figura 1). Segundo Freitas (2009), as rizobactérias são altamente influenciadas pelas condições do solo. Neste experimento provavelmente houve um favorecimento da multiplicação de bactérias no solo em detrimento da população de nematóides. Dos 10 isolados avaliados no ensaio em casa de vegetação, foi possível identificar cinco, sendo três pertencentes ao gênero *Bacillus* e, dois, ao gênero *Pseudomonas*. De acordo com Romeiro & Garcia (2009), certas bactérias benéficas como as rizobactérias, quando dispensadas em plantas são

capazes de promover o controle biológico de enfermidades por antagonismo direto, por indução de resistência ou por ambos os mecanismos. Entre as mais comuns e que atuam de forma efetiva, estão as bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*. As bactérias avaliadas neste estudo apresentaram potencial de biocontrole *in vivo*.

LITERATURA CITADA

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2009, 18 de agosto. *Sistemas de produção de bananeira irrigada*. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrigada/doencas.htm#nematoses>>.

FREITAS, LG. 2009. Rizobactérias versus nematóides. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acessado em 25 de junho de 2009.

NAVES, RL; CAMPOS, VP; SOUZA, RM. 2004. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 29: 384-388.

ROMEIRO, RS; GARCIA, FAO. 2009. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W; MORANDI, MAB. (eds). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 85-99.

Tabela 1. Porcentagem de nematoides mortos após 24 e 36 h de exposição a suspensão de metabólitos produzidos por rizobactérias. Percentage of dead nematodes after 24 and 36 h of exposure to rhizobacterial suspension of metabolites.

Rizobactéria	Nematóides mortos (%)		Variedade
	24 horas	36 horas	
3KB-PC	87,85 a A	87,85 a A	Prata Comum-meio KB
4KB-PC	61,78 b A	67,14 b A	
7KB-PC	65,55 b B	95,83 a A	
1KB-PC	55,67 b A	67,55 b A	
5KB-PC	61,07 b A	72,08 b A	
Controle	31,27 c A	46,07 b A	
24TSA-PC	92,26 a A	95,83 a A	Prata Comum-meio TSA
27TSA-PC	81,25 a A	93,75 a A	
16TSA-PC	80,20 a A	87,49 a A	
36TSA-PC	81,60 a A	87,50 a A	
25TSA-PC	71,11 b B	95,00 a A	
Controle	56,87 b A	58,95 b A	
5KB-PA	66,66 a A	75,00 a A	Prata Anã-meio KB
3KB-PA	68,12 a A	81,45 a A	
2KB-PA	71,66 a A	81,66 a A	
4KB-PA	63,75 a A	82,50 a A	
8KB-PA	77,49 a A	91,66 a A	
Controle	22,50 b A	31,25 b A	
31KB-PA	72,49 a A	82,77 a A	Prata Anã-meio KB
13KB-PA	57,50 b B	69,16 b A	
12KB-PA	79,44 a A	84,72 a A	
23KB-PA	70,62 a A	85,20 a A	
9KB-PA	72,57 a A	83,92 a A	
Controle	39,10 b A	55,35 b A	
19TSA-PA	87,50 a A	93,75 a A	Prata Anã-meio TSA
2TSA-PA	91,42 a A	96,42 a A	
12TSA-PA	53,86 b A	60,53 b A	
20TSA-PA	63,75 b A	80,41 a A	
3TSA-PA	83,92 a A	88,09 a A	
Controle	45,71 b A	54,87 b A	
17KB-CR	100,00 a A	100,00 a A	Crotalária-meio KB
19KB-CR	73,74 b A	79,16 b A	
18KB-CR	74,16 b A	74,16 b A	
16KB-CR	68,19 b A	83,19 b A	
Controle	47,50 b A	61,66 b A	
3TSA-CD	56,66 a A	79,16 a A	Tagetes-meio TSA
4TSA-CD	70,08 a A	90,17 a A	
5TSA-CD	45,23 b A	55,41 b A	
6TSA-CD	71,18 a A	91,42 a A	
7TSA-CD	63,53 a B	92,85 a A	
Controle	26,82 b A	40,00 b A	

Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período e letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos entre os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

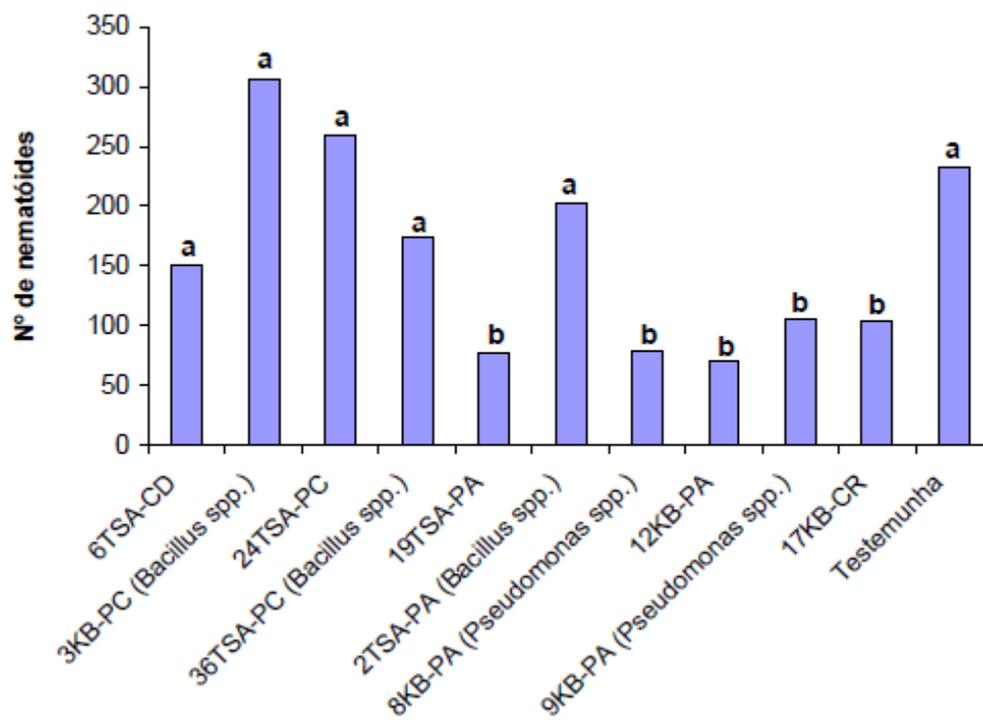


Figura 1. Número de nematóides em solo cultivado com mudas de banana tratadas com rizobactérias. Nematode number in banana cultivated soil treated with rhizobacteria.