

PROSPECÇÃO *IN VITRO* PARA BIOCONTROLADORES DO NEMATOIDE ANELADO DO PESSEGUEIRO

MOTA, Monalize Salete¹; NUNES, Rafael Barcellos²; SILVA, Fábio Sérgio Paulino³; ANACKER, Lauren Fonseca⁴; MOURA, Andrea Bittencourt⁵

¹Doutoranda Fitossanidade, Bolsista da CAPES, monalizem@yahoo.com.br;

²Graduando de Agronomia, Bolsista CNPq-ITIA, rafa_b_nunes@hotmail.com;

³Graduando de Biologia, Bolsista CNPq-ITIA, fabiopaulin@msn.com;

⁴Graduanda de Biologia, Bolsista CNPq-ITIA, lauren_anacker@hotmail.com;

⁵Professora do Departamento de Fitossanidade, andreabittencourtmoura@hotmail.com.
UFPel, CEP 96010-70, Pelotas, RS, Brasil

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de pêssigo (*Prunus persica* (L.) Batsch) representa uma das mais importantes atividades para o setor da fruticultura no estado do Rio Grande do Sul, sendo o responsável por 50% da produção nacional, em uma área de 15.000 ha. A longevidade dos pomares tem sido afetada devido à presença de nematóides, os quais são fitoparasitas que causam danos nas plantas pela ação nociva sobre o sistema radicular, além disso podem predispor a planta a doenças e a estresses ambientais ou atuarem como transmissores de outros patógenos (GOMES, 2003).

Dentre os nematoides que afetam a produção, se destaca o nematoide anelado, *Mesocriconema xenoplax* que é a espécie mais disseminada nas regiões de cultivo e provoca necroses nas radículas e reduz sua quantidade e volume; reduz a altura das plantas, a massa seca e o diâmetro do tronco; retarda o crescimento da planta, reduz a matéria fresca da planta inteira e o número de frutos produzidos (LOWNSBERY et al., 1977; NYCZEPIR et al., 1988), levando a morte precoce do pessegueiro.

Até o momento não existem cultivares resistentes a essa espécie de nematoide e o controle químico é pouco indicado e os nematicidas quase inexistentes e inespecíficos, além de economicamente inviáveis e pouco eficientes, além de em excesso serem tóxicos ao homem e ao ambiente. Em razão disso, o uso de biocontroladores tem sido uma medida recomendada, já que os estudos demonstram que há mais de 200 espécies diferentes de organismos, os quais são inimigos naturais dos nematoides, como fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros e outros (POINAR; JANSSON, 1988 a, b; KERRY, 1990)

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar biologicamente isolados bacterianos obtidos de diferentes hospedeiros, com potencial para biocontrole de *M. xenoplax*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Foram utilizadas 752 bactérias obtidas de plantas de alho (*Allium sativum* L.), de arroz (*Oryza sativa* L.), de cebola (*Allium cepa* L.), de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), da

rizosfera de pessegueiro (*Prunus persica* L.), e da rizosfera de diversos hospedeiros. Estas bactérias foram isoladas e cultivadas em meio KADO e HESKETT (1970) e testadas quanto à atividade enzimática e produção compostos tóxicos.

Produção de proteases – os isolados foram avaliados para duas metodologias. Para a hidrólise de Leite de Litmus® (Difco), os isolados foram repicados para tubos contendo meio de cultura, incubados a 28°C/10 dias, sendo avaliados aos 4 e 10 dias, pela observação da ocorrência ou não de alteração do meio leitoso para translúcido(SCHAAD et al., 2001); para hidrólise de gelatina, os mesmos foram repicados e incubados da mesma forma que o anterior, porém as avaliações basearam-se na solidificação do meio (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Produção de lípases - a capacidade lipolítica foi avaliada utilizando-se o teste com meio de cultura Tween 80, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura, e incubados a 28°C/7 dias (FAHY; PERSLEY, 1983). O teste de fosfatase foi avaliado utilizando meio NBRIP, pH 6,0 e avaliações realizadas aos 7, 14 e 21 dias.

Produção de fosfatases- Para avaliar a solubilização de fosfatos, os isolados foram repicados para meio de cultura 1/10 TSA acrescido de CaHPO₄. As placas foram incubadas a 28°C e as avaliações ocorreram aos 7, 14 e 21 dias, observando-se a formação de um halo de degradação.

Produção de amônia - os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio constituído por caldo de peptona e incubados a 28°C/5 dias, após adicionado 1mL do reagente de Nessler. A produção de amônia pelos isolados bacterianos foi observada pela mudança de coloração para amarelo-alaranjado. (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com os resultados, das 752 bactérias isoladas do filoplano 43% produziram fosfatases; produziram proteases, 69% para o teste de gelatina e 54% para o teste de Litmus; e 52% foram capazes de produzir lípases (Figura 1A). Dentre os 752 isolados, 14% foram positivos para todos os testes realizados (Figura 1B).

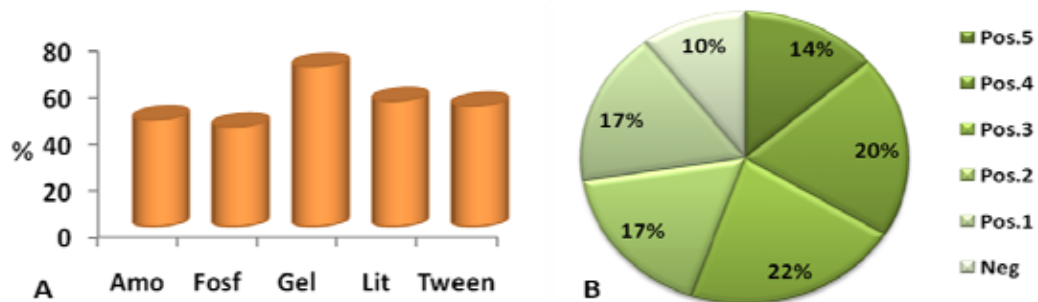


Figura 1 – A) Percentual de isolados positivos para cada um dos testes; B) Percentual geral de isolados positivos para 5, 4, 3, 2, 1 testes e negativo.

Quando se fez análise dos resultados de isolados por hospedeiro, conforme a tabela 1, a maior porcentagem de isolados bacterianos capazes de produzir alguma atividade enzimática ou algum composto tóxico, foi observada pa os isolados oriundo de plantas de de alho, seguido pelos isolados de plantas de

arroz e cebola. Os isolados de arroz descaram-se por não apresentarem resultado negativo, pois levando-se em consideração todos os testes apresentou pelo menos um isolado positivo para algum dos testes. A partir dados e levando-se em conta os testes utilizados, os isolados obtidos a partir de plantas de alho demonstraram possuir maior potencial para serem utilizados no controle biológico de nematoides. Porém, de acordo com Melo (2000), o ideal é utilizar antagonistas obtidos no mesmo habitat do que o patógeno-alvo.

Tabela 1 – Percentagem de isolados positivos e negativos conforme o local de isolamento.

Hospedeiro	%Pos5	%Pos4	%Pos3	%Pos2	%Pos1	%Zero
Alho	25,4	31,2	22,1	12,3	7,4	1,6
Feijão	10,4	24,5	21,7	14,2	17,9	11,3
Arroz	20,0	22,5	17,5	22,5	15,5	0
Cebola	19,0	29,3	27,6	12,1	10,3	3,5
Rizosfera						
Pessegueiro	3,4	9,9	22,8	23,2	22,8	17,7
Rizosfera Div. Hosp.	17,5	18,1	19,7	15,8	18,1	10,9

Deste modo, apesar do baixo índice, apresentado por isolados bacterianos obtidos a partir da rizosfera de pessegueiro, positivos para os cinco testes, são eles importantes candidatos a ser usados em programas de controle biológico de nematoides. Podendo, estes isolados, tratar-se de rizobactérias, as quais podem apresentar efeitos adicionais desejáveis, como ganhos na produção que são amplamente relatados na literatura para plantas anuais (BHARATI et al., 2004; LAZZARETTI, MELO, 2005;), porém para perenes, o número de trabalhos ainda é reduzido, embora existam alguns com resultados positivos (ARDUIM, 2006; GARCIA et al., 2004).

O controle de nematoides por bactérias pode ser alcançado de várias formas: competição por nutriente (KLOEPPER et al., 1980), produção de enzimas (quitinases, lípases e proteases) e metabólitos tóxicos que podem atuar como nematicidas e ou afetar a motilidade do nematoide, enquanto outras podem atuar sobre a eclosão de ovos (OKA et al., 1993), pela produção de sideróforos (DUIJF et al., 1993) e indução de resistência sistêmica (CHEN et al., 1995; LIU et al., 1995), sendo improvável que apenas um mecanismo possa agir isoladamente.

4 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos de diferentes nichos apresentam várias atividades enzimáticas e produção de compostos tóxicos que potencializam o uso no controle biológico de *M. xenoplax*.

5 REFERÊNCIAS

- ARDUIM, G.S. **Utilização e caracterização biológica de rizobactérias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 65p., 2006.
- BHARATHI, R.; VIVEKANANTHAN, R.; HARISH, S.; RAMANATHAN, A.; SAMIYAPPAN, R. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. **Crop Protection**, v.23, p.835–843, 2004.
- CHEN, Z. X., DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Effects of soil treatments on the survival of soil microorganisms. **Journal of Nematology**, v.27, n.4, p.661-663, 1995.
- DUIFF, B.J.; MEIJER, J.W.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Siderophore mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of

- carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Netherlands Journal Plant Pathology**, v.99, p.277-289, 1993.
- FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. *Plant Bacterial Diseases*. Academic Press Australia, 1983.
- GARCÍA, J.A.L.; DOMENECH, J.; SANTAMARÍA, C.; CAMACHO, M.; DAZAB, A.; MAÑERO, F.J.G. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. **Environmental and Experimental Botany**, v.52, p.239-251, 2004.
- GOMES, C.B.; CAMPOS, A.D. **Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de produção. Agosto de 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessegueo/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/nemato.htm>. Acesso em: 25 agosto 2010.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 24-30, 1970.
- KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.22, p.621-631, 1990.
- KLOPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.
- LAZZARETTI, E.; MELO, I.S. de **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 21p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).
- LIU, L., KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance against cucumber bacterial angular leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* p.v. *lachrymans* with two plant growth-promoting rhizobacterial strains. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995a.
- LOWNSBERY, B.F.; ENGLISH, H.; NOEL, G.R.; SCHICK, F.J. Influence of NemaGuard and Lovell rootstocks and *Macroposthonia xenoplax* on bacterial canker of peach. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.9,n.3, p.221-224, 1977.
- MARIANO, R.; SILVEIRA, E.B. da **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2ªed. Recife. UFRP, 2005.
- MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, v.2. 2000.
- NYCZEPIR, A.P.; WOOD, B.W. Peach leaf senescence delayed by *Criconemella xenoplax*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.20, n.4, p.585-589, 1988.
- OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloydogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biological Science and Technology**, v.3, p.115-126, 1993.
- POINAR Jr., G. O. & H. JANSSON (eds.). **Diseases of nematodes**. Vol. I CRC Press, Boca Raton, Florida. 149p, 1988.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul: **The American Phytopathology Society**, 2001.
- WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D. Inhibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, v.83, p.1245-1249, 1993.