

Obtenção de Bactérias para a o Biocontrole de *Meloidogyne javanica* por Meio de Aquecimento de Solo e Tratamento com Filtrado de Raízes de Plantas Antagonistas a Fitonematóides

Cleia F.S. Fabry¹, Leandro G. Freitas¹, Wânia S. Neves¹, Marcelo M. Coutinho¹, Marcos R. Tótola², José R. Oliveira¹, Rosangela Dallemole-Giaretta¹ & Silamar Ferraz¹

¹Departamento de Fitopatologia; ²Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, e-mail: clfabry@hotmail.com

Autor para correspondência: Cléia F.S. Fabry

FABRY, C.F.S., FREITAS, L.G., NEVES, W.S., COUTINHO, M.M., TÓTOLA, M.R., OLIVEIRA, J.R., DALLEMOLE-GIARETTA, R. & FERRAZ, S. Obtenção de bactérias para a o biocontrole de *Meloidogyne javanica* por meio de aquecimento de solo e tratamento com filtrado de raízes de plantas antagonistas a fitonematóides. Fitopatologia Brasileira 32:079-082. 2007.

RESUMO

Cinco amostras de solo com alto teor de matéria orgânica (10,14 dag/kg) de 1 kg cada foram autoclavadas (120 °C/1h), cinco foram aquecidas em forno de microondas a 660 watts e 2450 Hz por 4 min e cinco não foram aquecidas. Raízes de *Mucuna aterrima*, *Crotalaria juncea*, *Tagetes erecta* e *Lycopersicon esculentum* foram maceradas separadamente em liquidificador à baixa velocidade durante 30 s em 1000 mL de água e peneiradas. As suspensões resultantes foram adicionadas às amostras de solos as quais foram acondicionadas em saco plástico e submetidas aos três tratamentos térmicos e posteriormente mantidas a 28 °C por 24 h. Setenta e oito isolados bacterianos foram obtidos das amostras de solo por diluição em série e submetidos à seleção para o biocontrole de *M. javanica*. Sementes de tomate foram microbiolizadas por imersão em suspensão de propágulos de cada uma das culturas e semeadas em substrato dentro de tubetes em casa de vegetação. As mudas resultantes foram inoculadas com 400 ovos do nematóide, cada. O isolado UFV-6 de *Escherichia coli* reduziu o número de galhas em maior magnitude (80%) ao passo que o isolado UFV-8 de *Citrobacter freundii* foi o mais eficiente na redução do número de ovos (83%). A identificação dos isolados foi feita por análise de ácidos graxos ésteres de metil e testes bioquímicos.

Palavras-chave adicionais: isolamento, controle biológico, tratamento térmico, nematóide das galhas.

ABSTRACT

Obtaining bacteria for the biocontrol of *Meloidogyne javanica* by heating soil and treating it with root filtrates from plants antagonistic to nematodes

Five samples of 1 kg each of organic soil (10.14 dag/kg) were autoclaved at 120 °C for 1 hour, five were heated in a 660 watt and 2450 Hz microwave oven at full power for 4 min, and five were not heat-treated. Roots of *Mucuna aterrima*, *Crotalaria juncea*, *Tagetes erecta* and *Lycopersicon esculentum* were macerated, separately, in 1000 ml of tap water in a blender at low speed for 30 s, then sieved. Each of the resulting suspensions or just tap water (control treatment) was poured on one of the different soil samples inside a plastic bag and stored at 28 °C for 24 h. Seventy-eight bacterial isolates were obtained from the soil samples by serial dilution and selected for a subsequent assay for the biocontrol of *Meloidogyne javanica*. Tomato seeds were soaked in suspension of each bacterial isolate, then sowed in substrate inside plastic tubes in the greenhouse. The seedlings were each inoculated with 400 eggs of the nematode. The isolate UFV-6 of *Escherichia coli* reduced the number of galls to the highest extent (80%), and UFV-8 of *Citrobacter freundii* was the most effective in reducing number of eggs (83%). The identification of the isolates was done by fatty acid analyses and biochemical tests.

Additional keywords: isolation, biological control, thermic treatment, root-knot nematode.

Estudos com rizobactérias e bactérias endofíticas de raízes de plantas mostraram o potencial desses microrganismos em reduzir os danos causados por fitonematóides (Siddiqui *et al.*, 2003). A ocorrência de bactérias na rizosfera de plantas antagonistas, diferentes das usualmente encontradas na rizosfera de plantas cultivadas,

é um conhecimento relativamente novo e abre perspectivas para se encontrar isolados com maior eficiência para o controle biológico de fitonematóides. Portanto, diferentes espécies vegetais permitem melhor desenvolvimento de determinadas rizobactérias e bactérias endofíticas, e podem ser exploradas para o isolamento de grupos diferentes desses microrganismos. Outro fator que pode ser investigado para aumentar as chances de se isolar rizobactérias com potencial de biocontrole de nematóides é a utilização de calor (Stapleton & Devay, 1982). O aquecimento do solo pode dar

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. 2002.

uma vantagem competitiva aos organismos benéficos em relação aos fitopatógenos.

Segundo Oostendorp & Sikora (1989), menos de 10% dos isolados bacterianos obtidos apresentam biocontrole de fitonematóides o que demanda testes de seleção massal com grande número de isolados. Este trabalho teve como objetivos desenvolver métodos que aumentem a eficiência do isolamento de rizobactérias e selecionar isolados mais promissores para o controle de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, em tomateiro.

As populações do nematóide das galhas, *M. javanica*, foram multiplicadas em tomateiro Santa Cruz 'Kada', plantadas em vasos com solo previamente tratado com brometo de metila. Os ovos utilizados nos experimentos foram extraídos das raízes pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). As suspensões de ovos foram calibradas com auxílio de câmara de Peters, utilizando microscópio estereoscópio.

Para obtenção dos isolados bacterianos utilizou-se solo de mata, previamente espalhado sobre folhas de jornal em bancada em casa de vegetação por 15 dias para secagem. Dez quilogramas de solo de terriço de mata foram submetidos duas vezes a autoclavagem (120 °C por 1 h) e 10 kg foram submetidos à irradiação em forno de microondas de 660 W a 2450 Hz por 4 min em lotes de 1 kg de solo em saco plástico aberto, e 10 kg de solo do tratamento testemunha não foram submetidos a nenhum tratamento térmico. Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), mucuna preta (*Mucuna aterrima* Merr.), crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e cravo-de-defunto (*Tagetes erecta* L.) foram cultivadas em campo e, no período de floração, retiradas do solo e colhidos seus sistemas radiculares. Sessenta gramas de raízes de cada espécie foram picadas em pedaços de 1 a 2 cm de comprimento e triturados em baixa velocidade em liquidificador durante 30 s em 1 l de água de torneira. Os homogêneos foram passados em peneira com malha de 1 mm e adicionados, separadamente, a 6 kg de solo de cada tratamento térmico (microondas ou autoclave) e do solo não tratado, acondicionados em sacos plásticos. Água de torneira foi adicionada como tratamento testemunha nos solos submetidos aos tratamentos térmicos e não tratado. Os tratamentos resultaram nas seguintes combinações: 1) *T. erecta* - solo natural, 2) *T. erecta* - solo irradiado, 3) *T. erecta* - solo autoclavado; 4) *C. juncea* - solo natural, 5) *C. juncea* - solo irradiado, 6) *C. juncea* - solo autoclavado; 7) *M. aterrima* - solo natural, 8) *M. aterrima* - solo irradiado, 9) *M. aterrima* - solo autoclavado; 10) *L. esculentum* - solo natural, 11) *L. esculentum* - solo irradiado, 12) *L. esculentum* - solo autoclavado; 13) água - solo natural, 14) água - solo irradiado, 15) água - solo autoclavado. Os sacos foram mantidos em incubadora a 28 °C durante 24 h. Frações de cada solo tratado foram utilizadas para o isolamento das bactérias por diluição em placas de Petri conforme descrito por Romeiro (2001). Uma alíquota de 50 µL de cada diluição foi depositada e espalhada com espátula de Drigalsky em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo o meio 523 de

Kado & Heskett (1970). As placas foram mantidas durante 24 h em incubadora a 28 °C. As colônias que surgiram foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio 523 e estes levados para incubadora com a mesma temperatura e pelo mesmo tempo.

Para seleção massal dos isolados bacterianos misturou-se solo de mata, não esterilizado, com substrato organo-vegetal (PLANTAGRO®), na proporção 1:1 (v:v). Sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas utilizando-se o método descrito por Oostendorp & Sikora (1989) modificado para 24 h. As sementes foram imersas em suspensões aquosas dos isolados bacterianos e mantidas em laboratório a temperatura ambiente. Para o tratamento testemunha, as sementes permaneceram em água destilada. Quando as plantas estavam com aproximadamente 10 cm de altura, 2 mL da suspensão de ovos de *M. javanica* contendo 400 ovos foram depositados nos tubetes. Após 60 dias retiraram-se as plantas e o peso da parte aérea, altura das plantas e o número de ovos e de galhas por sistema radicular foram avaliados.

Os isolados bacterianos que se mostraram mais promissores no controle de *M. javanica* foram identificados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) segundo a metodologia descrita por Kloepper *et al.* (1992). Para a confirmação dos resultados da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos, os testes de reação de Gram utilizando a técnica de solubilidade em KOH 3%, formação de endósporos foram realizadas seguindo os métodos descritos por Schaad *et al.* (2001).

Os dados foram analisados pelo programa Statistica (2001). As médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade e a variável número de ovos foi transformada utilizando-se a função log x. O experimento constou de 6 repetições e foi delineado inteiramente ao acaso.

Foram obtidos 78 isolados bacterianos, nomeados UFV-1 a UFV-78 sendo que foi possível obter bactérias de solos de todos os tratamentos (Tabela 1). Dos 78 isolados testados, 57 reduziram o número de galhas e 22 não apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. Quanto ao número de ovos, 26 resultaram em redução, 44 não diferiram da testemunha e 9 isolados estimularam o seu aumento. Para a variável galhas, o UFV-6 foi o isolado que se destacou, resultando em 80% menos galhas do que na testemunha (Figura 1A). Para a variável ovos, o melhor isolado foi o UFV-8 com redução de 83% no número de ovos por planta. (Figura 1B). Os isolados UFV-48 e UFV-29 foram os menos eficientes, permitindo o aumento do número de ovos em 134,3% e 117,78%, respectivamente.

Estudos da rizosfera de plantas antagonistas também foram realizados por Kloepper *et al.* (1991). Os autores observaram que o número de isolados eficientes no controle dos fitonematóides foi de 4 a 6 vezes maior entre aqueles provenientes das plantas antagonistas do que de soja, a espécie suscetível.

Os isolados UFV-29 e UFV-32 proporcionaram

TABELA 1 - Isolados de bactérias obtidos de solo submetidos ou não a irradiação, autoclavagem, seguido da adição de filtrados de raízes de *T. erecta*, *C. juncea*, *M. aterrima* ou *L. esculentum* crescidos no campo

Espécie Vegetal	Tratamento Térmico	Isolados
<i>T. erecta</i>	Não tratado	UFV-28, UFV-29, UFV-41, UFV-57, UFV-62, UFV-75, UFV-34
<i>T. erecta</i>	Irradiado	UFV-2, UFV-6, UFV-33, UFV-42
<i>T. erecta</i>	Autoclavado	UFV-50, UFV-66, UFV-68
<i>C. juncea</i>	Não tratado	UFV-1, UFV-16, UFV-65
<i>C. juncea</i>	Irradiado	UFV-9, UFV-14, UFV-24, UFV-64, UFV-69, UFV-77
<i>C. juncea</i>	Autoclavado	UFV-3, UFV-5, UFV-11, UFV-37, UFV-40, UFV-60, UFV-61
<i>M. aterrima</i>	Não tratado	UFV-17, UFV-27, UFV-30, UFV-59
<i>M. aterrima</i>	Irradiado	UFV-8, UFV-25, UFV-32, UFV-53
<i>M. aterrima</i>	Autoclavado	UFV-15, UFV-45, UFV-54, UFV-63, UFV-67
<i>L. esculentum</i>	Não tratado	UFV-7, UFV-43, UFV-48, UFV-56, UFV-76
<i>L. esculentum</i>	Irradiado	UFV-22, UFV-23, UFV-49, UFV-52, UFV-58, UFV-74
<i>L. esculentum</i>	Autoclavado	UFV-13, UFV-35, UFV-44, UFV-18, UFV-73
Testemunha (água)	Não tratado	UFV-10, UFV-39, UFV-47, UFV-51, UFV-70
Testemunha (água)	Irradiado	UFV-19, UFV-31, UFV-46, UFV-71, UFV-72, UFV-78
Testemunha (água)	Autoclavado	UFV-4, UFV-12, UFV-20, UFV-21, UFV-26, UFV-36, UFV-38, UFV-55

aumento do número de ovos de *M. javanica*. Observa-se que nem todas as bactérias provenientes de homogeneizados de raízes de plantas antagonistas e solos submetidos a tratamentos térmicos apresentaram efeitos benéficos no controle do patógeno, pois na rizosfera dessas plantas, assim como nas de não antagonistas, encontram-se microorganismos benéficos, neutros e prejudiciais. Oostendorp & Sikora (1989) isolaram 290 rizobactérias de beterraba açucareira e testaram seu efeito contra *Heterodera schachtii* (Schmidt) Skarbilovich. Dessas, 21 reduziram o número de nematóides e 15 estimularam a infecção por eles. O tratamento térmico por microondas resultou no isolamento de cinco das dez bactérias mais eficientes e a incorporação de filtrados de raízes de *Tagetes erecta* e *Mucuna aterrima* no solo resultou no posterior isolamento de sete das dez bactérias mais eficientes no controle do nematóide, possivelmente pela infestação do solo com isolados da rizosfera ou do interior das raízes.

Os seis isolados mais promissores no controle de *M. javanica* foram identificados como *Acidovorax facilis* (Schatz & Bovell) Willems *et al.* (UFV 41); *Escherichia coli* T. Escherich, (UFV6); *Enterobacter intermedius* corrig. Izard *et al.* (UFV25); *Acidovorax facilis* (Schatz & Bovell) Willems *et al.* (UFV53); *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (UFV57) e *Citrobacter freundii* (Braak) Werkman & Gillen (UFV8). Para as provas bioquímicas, todos os isolados foram identificados como Gram negativos. Nenhum dos isolados apresentou formação de endósporos.

A bactéria *E. coli* pode ser encontrada em fezes de animais e no trato gastro-intestinal humano, sendo, nesse caso, indicativa de contaminação alimentar. Entretanto, esta espécie bacteriana também é comumente encontrada no solo, associada as raízes de plantas (Ritchie *et al.* 2003), daí a possibilidade de seu isolamento neste estudo. Espécies do gênero *Enterobacter* são encontradas em ambientes naturais como esgoto, solo e vegetais (Krieg & Holt,

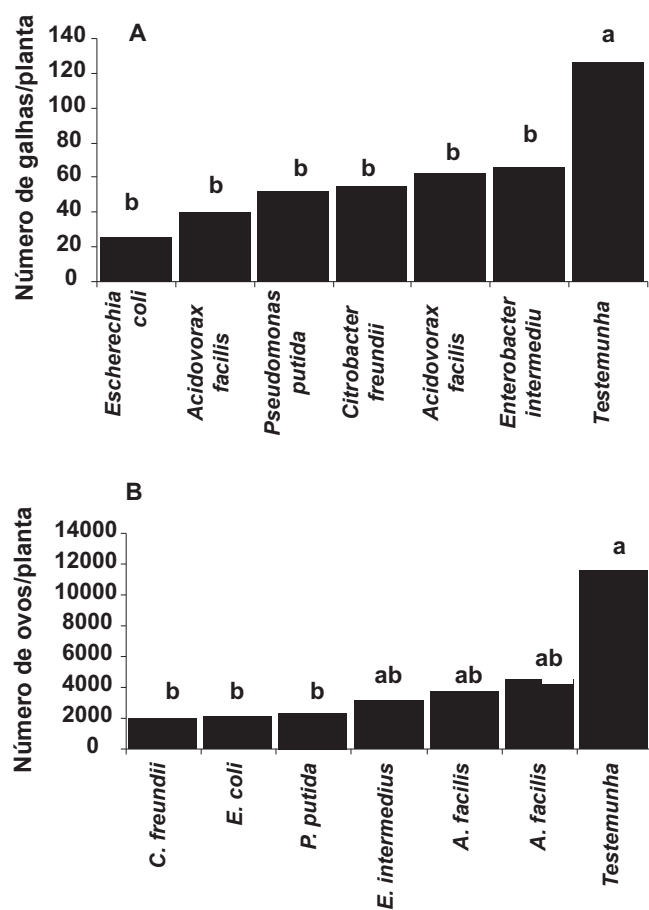


FIG. 1 - Efeito antagonístico de seis isolados bacterianos pré-selecionados para controle de *M. javanica* em tomateiro. A) média do número de galhas; B) média do número de ovos por tomateiro. As médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls a 5% de probabilidade, enquanto que as médias da variável número de ovos foram previamente transformadas utilizando-se a função log x.

1984). Entretanto, algumas espécies são também relatadas como rizobactérias exibindo antagonismo a fitopatógenos (Hebbar *et al.*, 1992). Os membros do gênero *Citrobacter* não ocorrem somente em fezes de homens e animais, mas também em água, esgoto, solo e alimentos. *Acidovorax* spp. são encontradas também em solo e água além de serem importantes patógenos de plantas (Krieg & Holt, 1984).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a utilização de solo rizosférico e raízes de plantas antagonistas, combinado com tratamentos térmicos do solo, propiciam o isolamento de maior proporção de bactérias biocontroladoras de *M. javanica*, apesar de ainda se encontrar no conjunto, bactérias prejudiciais e neutras.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de café. Fitopatologia Brasileira 6:553. 1981.
- HEBBAR, K.P., DAVEY, A.G. & DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: Isolation and identification. Soil Biology and Biochemistry 10:979-987. 1992.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028. 1973.
- KADO, C.I & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-979. 1970.
- KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A. & COLLINS, D.J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms. Plant and Soil 136:95-102. 1991.
- KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A. & YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. Plant and Soil 139:74-84. 1992.
- KRIEG, N.R & HOLT, J. G. (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore. Williams & Wilkins. 1984.
- OOSTENDORP, M. & SIKORA, R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. Revue de Nématologie 12:77-83. 1989.
- RITCHIE, J.M., CAMPBELL, G.R., SHEPHERD, J., BEATON, Y., JONES, D., KILLHAM, K. & ARTZ, R.R.E. A stable bioluminescent construct of *Escherichia coli* 0157:H7 for hazard assessments of long-term survival in the environment. Applied and Environment Microbiology 69:3359-3367. 2003.
- ROMEIRO, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa MG. UFV. 2001.
- SCHAAD, N.W, JONES, J.B. & CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. Saint Paul MN. APS Press. 2001.
- SIDDIQI, I.A., SHAUKAT, S.S., KHAN, G.H. & ALI, N.I. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S⁺ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. Soil Biology and Biochemistry 35:1625-1634. 2003.
- STAPLETON, J.J. & DEVAY J.E. Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. Phytopathology 72:323-326. 1982.
- STATSOFT, Inc. Statistica (Data Analysis Software System) version 6. 2001. (Software estatístico)

Recebido 12 Abril 2006 - Aceito 12 Fevereiro 2007 - FB 5033