

Notas Científicas

Antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariotas

Victor Rafael Barra⁽¹⁾, Reginaldo da Silva Romeiro⁽¹⁾, Flávio Augusto de Oliveira Garcia⁽¹⁾, Andréa Bittencourt Moura⁽²⁾, Harllen Sandro Alves Silva⁽³⁾, Henrique Lopes Mendonça⁽¹⁾ e Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: victorbarra@gmail.com, rromeiro@ufv.br, msfa_garcia@yahoo.com.br, henlopes@ufv.br ⁽²⁾Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: andreabittencourtmoura@hotmail.com ⁽³⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: harllen@cnpmf.embrapa.br ⁽⁴⁾Embrapa Roraima, BR-174, Km 8, Bairro Industrial, CEP 69301-970 Boa Vista, RR. E-mail: halfeld@cpafrr.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar procariotas quanto ao potencial de antagonismo direto para o biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Avaliaram-se 45 isolados bacterianos pelo teste de antibiose contra o patógeno. Foram feitos dois ensaios em que sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Santa Clara foram infectadas com isolados antagonísticos. As mudas foram transplantadas para solos infestados com suspensões de propágulos *P. carotovorum* com OD₅₄₀ de 0,45 e 0,65. Os antagonistas UFV-0005, UFV-043, UFV-BF112 e UFV-0006 foram eficientes em proteger plantas de tomateiro contra a podridão-mole.

Termos para indexação: *Lycopersicon esculentum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, antibiose, controle biológico, rizobactérias.

Direct antagonism and biocontrol of tomato soft rot using prokaryotes

Abstract – This work aimed to evaluate prokaryotes to provide direct antagonism and biocontrol of tomato soft rot (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Forty-five bacterial isolates previously selected for biological control of several tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) diseases were evaluated using an antibiosis test. 'Santa Clara' tomato seeds were inoculated with potential antagonist isolates and transplanted to a soil infested with the pathogen, in two assays, at a propagule concentration of OD₅₄₀ 0.45 and 0.65. Antagonists UFV-0005, UFV-043, UFV-BF112, and UFV-0006 protected tomato plants against soft rot disease.

Index terms: *Lycopersicon esculentum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, antibiosis, biological control, rhizobacteria.

Doenças bacterianas são uma das principais causas de redução da produção em lavouras (Romeiro, 2005). Não existem produtos eficientes para o controle da maioria dessas doenças. O controle tem sido feito por meio de práticas culturais. O controle biológico tem demonstrado ser alternativa para o manejo de bacterioses em plantas (Romeiro, 2007a).

Há relatos na literatura do uso do controle biológico com sucesso, a exemplo do biocontrole da galha-bacteriana [*Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942] pelo isolado bacteriocinogênico de *A. radiobacter* (Kerr, 1980; Kerr & Tate, 1984). Existem também relatos com biocontrole

de doenças de plantas promovido por espécies de *Pseudomonas* sp. (Chin-a-Woeng et al., 2003).

No caso da podridão-mole, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben et al. 1999 emend. Gardan et al. 2003, o uso do controle biológico tem sido tentado por muitos pesquisadores (Abdelghafar & Abdelsayed, 1997; Dong et al., 2004; Zamanian et al., 2005; Cladera-Olivera et al., 2006).

Especificamente para a cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), não há relatos do uso do biocontrole da doença nem são conhecidas cultivares resistentes à doença.

Este trabalho teve como objetivos avaliar procariotas com potencial para o antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro e testar a eficácia do biocontrole dessa doença.

A bactéria fitopatogênica *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e os 45 agentes de biocontrole foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Todos os procariotas foram cultivados no meio 523 (Kado & Heskett, 1970), a 28°C, por 24 horas (Romeiro, 2001).

Para o ensaio de antibiose in vitro, os agentes de biocontrole foram repicados em placas de Petri com o meio 523 sólido, em quatro pontos equidistantes, e incubados por 48 horas, a 28°C. Após o crescimento dos procariotas, as placas foram invertidas, e depositou-se 1 mL de clorofórmio na superfície interna da tampa de cada uma delas. Aguardou-se 20 min para que as colônias do antagonista fossem mortas. As placas foram, então, entreabertas por 30 min para eliminação do resíduo de clorofórmio. A cada placa, adicionaram-se 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente (48°C) com 0,1 mL de suspensão de células de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, de modo a formar uma sobrecamada de aproximadamente 1 mm de espessura. As placas foram incubadas novamente, da mesma forma descrita anteriormente, e examinadas periodicamente quanto à presença de halos de inibição.

Foram realizados dois bioensaios in vivo em câmara de crescimento, com temperatura ajustada para 30°C, em dezembro de 2005 e abril de 2006, com 14 isolados selecionados no ensaio in vitro de antagonismo à Pcc. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com dez repetições, e a parcela experimental foi constituída de duas plantas. Sementes de tomate cv. Santa Clara foram infectadas com propágulos dos agentes de biocontrole (Romeiro, 2007b) e semeadas em bandejas com substrato à base de vermiculita. Após o aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras, as plântulas foram transplantadas para vasos com solo infestado com Pcc. O tratamento-controle, nos dois ensaios, foi constituído por plantas oriundas de sementes imersas em água destilada pelo mesmo tempo utilizado na infestação com os agentes de biocontrole.

No primeiro ensaio, as plantas foram transplantadas para solo infestado com suspensão de propágulos de Pcc com OD₅₄₀ de 0,45, 27 dias após a germinação. No segundo experimento, a suspensão de propágulos

teve OD₅₄₀ de 0,65, e o transplante das mudas foi realizado 24 dias após a germinação. Nos dois ensaios, avaliou-se a severidade da doença a partir da massa de matéria seca da parte aérea das plantas. Considerou-se a severidade inversamente proporcional à massa, já que a doença leva à perda de massa interna do caule das plantas, sintoma conhecido como talo oco. A escolha dessa variável como critério para medir a severidade foi feita com base no critério da praticidade. A avaliação dos sintomas causados por Pcc em plantas tem sido feita pelo tamanho de lesões (Chapon et al., 2002), incidência (Reinoso-Pozo et al., 2006) e percentual de área lesionada (Cladera-Olivera et al., 2006). Nenhum desses critérios, porém, é padrão para a avaliação da podridão causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Para a confirmação da etiologia bacteriana da podridão, as plantas que exibiam ou não os sintomas tiveram seções de seus caules submetidas ao teste de exsudação em gota (Romeiro, 2007b).

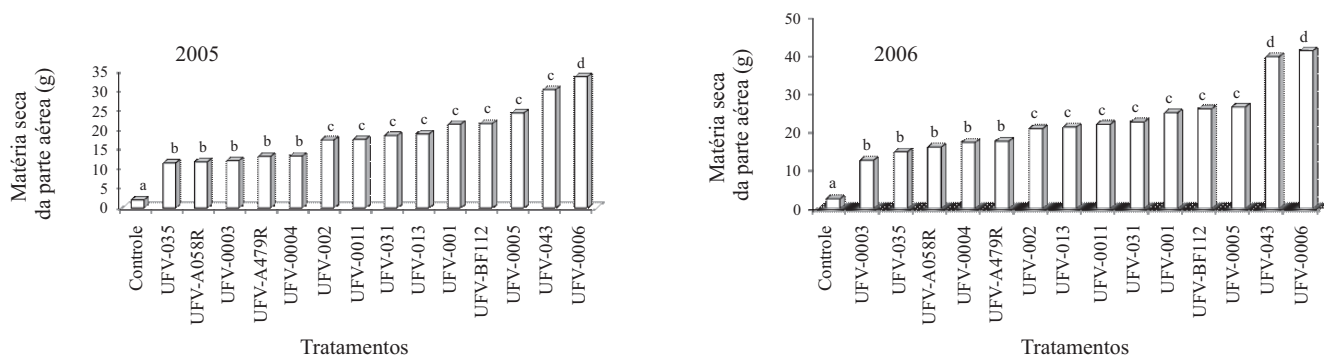
No ensaio de antibiose, dos 45 procariotas testados, 14 foram capazes de inibir o crescimento in vitro de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Tabela 1). A grande maioria dos 45 procariotas usados nunca havia sido testada contra Pcc, mas já havia sido testada contra patógenos da parte aérea (Moura & Romeiro, 1999; Halfeld-Vieira et al., 2004; Silva et al., 2004; Mendonça, 2006). A *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é um patógeno agressivo, capaz de fazer os tecidos infectados entrarem em colapso em poucas horas. Para que uma rizobactéria seja capaz de controlá-lo, é preciso que o controle seja por meio de antagonismo direto, pela produção de substâncias antimicrobianas às quais a Pcc seja sensível. O biocontrole de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* por esse mecanismo é amplamente relatado na literatura (Liao, 1989; Li et al., 2004; Alvarado et al., 2007; Roh et al., 2009).

Nos dois ensaios in vivo, as rizobactérias UFV-006 e UFV-043 foram os procariotas que mais se destacaram, embora outros tratamentos também tenham sido estatisticamente eficazes no controle do patógeno (Figura 1). O tratamento-controle em ambos os ensaios foi o que apresentou maior intensidade de podridão-mole, o que foi evidenciado pela menor massa de matéria seca da parte aérea.

Os isolamentos UFV-006 e UFV-043 apresentam potencial para uso no controle biológico de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em tomateiro.

Tabela 1. Presença ou ausência de halos de inibição no crescimento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, em decorrência da produção de substâncias antimicrobianas por alguns potenciais agentes de biocontrole.

Isolado	Diâmetro do halo (cm)	Isolado	Diâmetro do halo (cm)	Isolado	Diâmetro do halo (cm)
UFV-0001	0,0	UFV-035	0,5	UFV-005	0,0
UFV-0002	0,0	UFV-036	0,0	UFV-003	0,0
UFV-0003	0,4	UFV-A479R	0,8	UFV-B412R	0,0
UFV-0004	0,4	UFV-027	0,0	UFV-B224R	0,0
UFV-0006	0,5	UFV-028	0,0	UFV-B256R	0,0
UFV-0009	0,0	UFV-040	0,0	UFV-B316R	0,0
UFV-0010	0,0	UFV-010	0,0	UFV-B423R	0,0
UFV-0011	0,3	UFV-013	1,1	UFV-B403R	0,0
UFV-0005	0,4	UFV-001	0,3	UFV-B205R	0,0
UFV-A058R	1,3	UFV-007	0,0	UFV-B322R	0,0
UFV-029	0,0	UFV-008	0,0	UFV-BF04	0,0
UFV-030	0,0	UFV-009	0,0	UFV-BF112	0,6
UFV-031	1,0	UFV-004	0,0	UFV-0008	0,0
UFV-034	0,0	UFV-006	0,0	UFV-043	1,0
UFV-A094R	0,0	UFV-002	0,5	UFV-00001	0,0

**Figura 1.** Efetividade das rizobactérias em promover o biocontrole experimental da podridão-mole-do-tomateiro com relação à massa da matéria seca da parte aérea, nos ensaios conduzidos em 2005 e 2006. Barras seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento da pesquisa.

Referências

ABDELGHAFAR, N.Y.; ABDELSAYED, W.M. Biological control of bacterial soft rot of potato by using fluorescent pseudomonads. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v.5, p.419-431, 1997.

ALVARADO, I. del C.M.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R.; SILVA, A.M.F.; NASCIMENTO, C.W.A. Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade a *Pectobacterium*

carotovorum subsp. *carotovorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.222-228, 2007.

CHAPON, A.; GUILLERM, A.Y.; DELALANDE, L.; LEBRETON, L.; SARNIGUET, A. Dominant colonisation of wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.449-459, 2002.

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v.157, p.503-523, 2003.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; MOTTA, A.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.533-539, 2006.

DONG, Y.H.; ZHANG, X.F.; XU, J.L.; ZHANG, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a

- new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.954-960, 2004.
- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ROMEIRO, R.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Métodos de isolamento de bactérias de filoplano de tomateiro visando populações epifíticas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.638-643, 2004.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-979, 1970.
- KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, v.64, p.24-30, 1980.
- KERR, A.; TATE, M.E. Agrocins and the biological control of crown gall. **Microbiology Science**, v.1, p.1-4, 1984.
- LI, J.; WANG, H.; WANG, J. A bacteriocin with a broad spectrum activity produced by grapevine crown gall biocontrol strain E26. **Scientia Agricultura Sinica**, v.37, p.1860-1865, 2004.
- LIAO, C.H. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. **Plant Disease**, v.73, p.223-226, 1989.
- MENDONÇA, H.L. de. **Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro**. 2006. 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MOURA, A.B.; ROMEIRO, R. da S. In vitro evaluation of actinomycetes as antagonists to *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, p.281-288, 1999.
- REINOSO-POZO, Y.; CASADESUS-ROMERO, L.; GARCIA-SUAREZ, A.; GARCIA-PEREZ, E.; PAZOS-ALVAREZ-RIVERA, V. Study of the inhibitory effect of *Bacillus* spp. on the development of potato soft rot (*Solanum tuberosum* L.). **Fitosanidad**, v.10, p.289-293, 2006.
- ROH, E.; LEE, S.; LEE, Y.; RA, D.; CHOI, J.; MOON, E.; HEU, S. Diverse antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v.19, p.42-50, 2009.
- ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. 417p.
- ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 2007a. 269p.
- ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: UFV, 2007b. 172p.
- ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J.L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; MOUNTEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.371-375, 2004.
- ZAMANIAN, S.; SHAHIDI, G.H.; SAADOUN, I. First report of antibacterial properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (strain 101) against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* from Iran. **Biotechnology**, v.4, p.114-120, 2005.

Recebido em 29 de setembro de 2008 e aprovado em 30 de janeiro de 2009