



Autor(es): MARCELLY THAÍ DE CASTRO, ISABELLE CAROLYNE CARDOSO, ADELICA APARECIDA XAVIER, CLÁUDIA MARIA DA SILVA, REGINA CÁSSIA FERREIRA RIBEIRO, GLEIKA LARISSA OLIVEIRA DORASIO DE SOUZA

Efeito da Inoculação de Rizobactérias Sobre a Mortalidade e Motilidade de Nematóides das Galhas

Introdução

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* são fitopatógenos que formam galhas nas raízes do hospedeiro, dificultando a absorção de água e nutrientes do solo, o que pode levar à deficiência mineral e à perda na produtividade de diversas culturas (FANCELLI, 2006). Desse modo, o controle dos nematóides no solo é importante para o sucesso de culturas de grande importância econômica e pode ser realizado por vários métodos, dentre os quais se encontra o biológico.

Dentre os agentes de controle biológico merecem destaque as Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP's), que são microrganismos capazes de colonizar as raízes, podendo beneficiar a planta diretamente ou atuar no seu crescimento e desenvolvimento (RYU et al., 2005).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da inoculação de rizobactérias sobre a mortalidade e motilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Material e métodos

A. Preparo da suspensão bacteriana

Neste trabalho foram utilizados 5 isolados de rizobactérias oriundos de raízes de bananeira "Prata Anã". Os dados da sequência parcial da região 16S rRNA das bactérias identificadas foram depositadas na base de dados do GenBank.

As bactérias foram cultivadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar), em placas de Petri por um período de 24 h a 28°C e conservadas em água mineral autoclavada (estoque). Em seguida, os isolados foram submetidos ao ajuste da densidade óptica a 1,0 de absorbância, no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro. Para isso, foram inoculados 100 μ L do isolado estoque que foi cultivado em 100 mL de meio líquido TSB (Tryptic Soy Broth), mantidos em agitador automático a 120 rpm e temperatura de 28°C por um período de 48 h. Depois do período de crescimento, esses isolados foram transferidos para tubos que foram centrifugados por 10 minutos a velocidade de 10.000 rpm para precipitação das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e as suspensões foram preparadas adicionando-se ao precipitado a solução salina a 0,85% para posterior leitura no espectrofotômetro.

Aos nove dias de avaliação de colonização de raízes em trabalho realizado anteriormente, o volume restante das suspensões bacterianas associadas as raízes foi utilizado para a montagem da avaliação de mortalidade e motilidade de J2 de *Meloidogyne javanica* para servir de parâmetro para futuras avaliações com nematóide.

B. Avaliação da mortalidade e motilidade de *Meloidogyne javanica*

A partir de raízes de tomateiro com sintomas de galhas, procedeu-se a extração de ovos pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Os ovos obtidos foram colocados em câmaras de eclosão preparadas em placas de Petri contendo tela e papel de espessura fina, e foram mantidas a 28°C. Os juvenis de segundo estágio (J2) eclodidos no terceiro dia foram recolhidos e colocados em água, de tal forma que a suspensão final tivesse 1000 J2/mL. Em células de 300 μ l de placas de Elisa foram colocados 20 μ l de tal suspensão e 100 μ l da suspensão bacteriana descrita anteriormente (Figura 1A-B).

Após 24 horas, a avaliação de motilidade foi realizada pela contagem dos nematoides móveis e imóveis. A seguir, avaliou-se a mortalidade, conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000) que, fundamentalmente, consiste em adicionar uma a duas gotas de NaOH 1N à suspensão de nematoides (Figura 1A-B). A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e, vivos, os retorcidos. Empregou-se o delineamento inteiramente ao acaso. Foram avaliados 5 isolados de rizobactérias com 3 procedimentos e 5 repetições e, como testemunhas foram utilizadas água destilada e solução salina.

C. Análise dos dados

Os dados foram convertidos em porcentagem e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Tukey a 5%, por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Resultados e discussão

De acordo com as análises verificou-se que as rizobactérias avaliadas neste estudo influenciam na mortalidade de *M. javanica* ($p < 0,05$). O isolado 65 (*Bacillus amiloquefaciens*) foi o que provocou a maior taxa de Mortalidade (19,96%). Observa-se ainda, através dos dois tratamentos adicionais (solução salina e água destilada) que a mortalidade de *M. javanica* é acentuada com a presença da rizobactéria. Além disso, os cinco isolados influenciam na imobilidade de *M. javanica* na mesma intensidade, mas apresentam diferença em relação aos tratamentos adicionais (Tabela 1). Desse modo, as rizobactérias utilizadas neste trabalho podem ser submetidas à avaliações posteriores que complementem a sua caracterização como promissores agentes de controle biológico.

As rizobactérias apresentam mecanismos diretos e indiretos que podem contribuir para o controle biológico. Dentre os mecanismos diretos, pode-se citar a produção de quitinase, de lipase e de sideróforos (PRAKAMHANG et al., 2014; TIPRE et al., 2015). Entre os mecanismos indiretos estão aqueles relacionados com a produção de ácido indol-3-acético (ALMONEAFY et al., 2014), fixação biológica de nitrogênio (BALDANI et al., 2014) e solubilização de fosfato (KUMAR et al., 2015).

Conclusões

As rizobactérias avaliadas afetam a mortalidade e imobilidade de *M. javanica*.

O isolado 65 (*Bacillus amiloquefaciens*) provoca a maior taxa de Mortalidade em *M. javanica*.

Os isolados avaliados apresentam potencial para serem submetidos a outras avaliações que comprovem a eficácia como agentes de controle biológico.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, à FAPEMIG pela concessão da bolsa de incentivo à pesquisa e ao BIPDT pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências bibliográficas

- ALMONEAFY, A. A.; KAKAR, K. U.; NAWAZ, Z.; LI, B.; SAAND, M. A.; CHUN-LAN, Y.; XIE, G. L. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, v. 63, n. 2, p. 59–70, 2014.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v. 384, n. 1-2, p. 413–431, 2014.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. **Modificações do método de hussey e barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro**. v. 6 ed. [s.l.: s.n.]
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A Technique for Determining Live Second-stage Juveniles of *Heterodera glycines* 1. *Journal of nematology*, v. 32, n. 1, p. 117–121, 2000.
- FANCELLI, M. MANEJO INTEGRADO DE NEMATÓIDES NA CULTURA DA BANANEIRA. p. 331–338, 2006.
- FERREIRA, D. F. SISVAR : A Computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- KUMAR, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Plant growth-promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from *Hippophae rhamnoides* L. (Sea-buckthorn) growing in cold desert Trans-Himalayan Lahul and Spiti regions of India. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 37, n. 3, p. 1–12, 2015.
- PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K.; UCHIUMI, T.; ABE, M.; TEAUMROONG, N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. *Applied Soil Ecology*, v. 85, n. did, p. 38–49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.009>>.
- RYU, C.-M.; HU, C.-H.; LOCY, R. D.; KLOEPPER, J. W. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, v. 268, n. 1, p. 285–292, 2005.
- TIPRE, S.; PINDI, P. K.; SHARMA, S. Biotechnological potential of a *Halobacterium* of family Bacillaceae. v. 14, n. January, p. 65–71, 2015.



Tabela 1. Médias do efeito de 5 isolados de rizobactérias, oriundos de raízes de bananeira “Prata Anã”, sobre a mortalidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Tratamento	Gênero/espécie mais relacionado	Mortalidade de <i>M. javanica</i> (%)*	Imobilidade de <i>M. javanica</i> (%)*
41	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	10,82 b	18,6 b
65	<i>Bacillus amiloquefaciens</i>	19,96 c	16,6 b
†68		10,58 b	18,2 b
†70		10,98 b	18,2 b
†79		6,78 ab	18,8 b
Solução salina		2,0 a	4,0 a
Água destilada		1,96 a	3,4 a
CV (%)		39,76	20,42

*Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

†Isolado em fase de identificação.

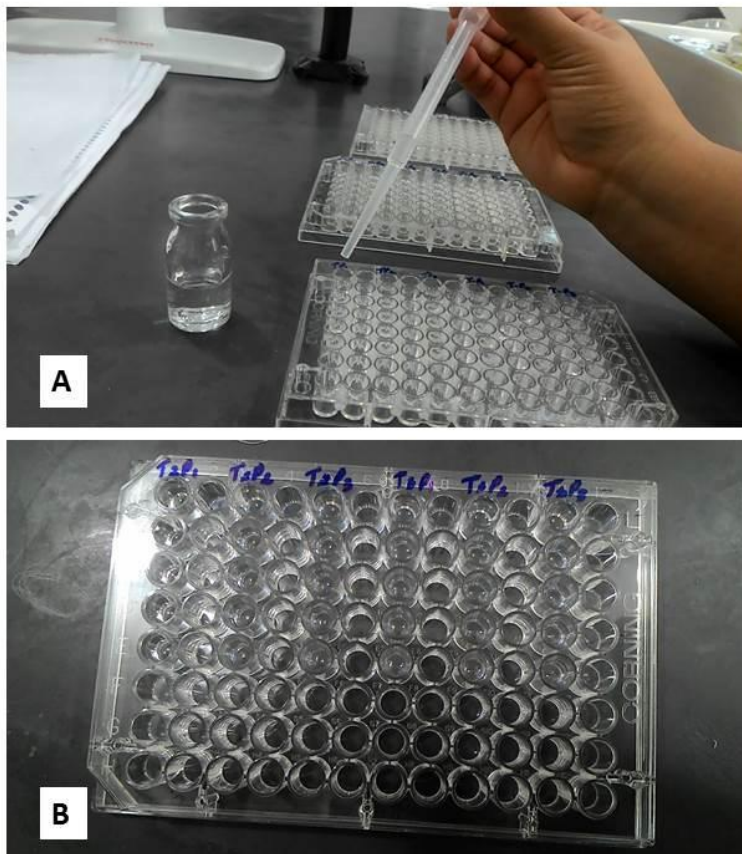


Figura 1. Metodologia utilizada para avaliar o efeito de 5 isolados de rizobactérias, oriundos de raízes de bananeira “Prata Anã”, sobre mortalidade e motilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* (A). Placas de Elisa com experimento em andamento para avaliação (B).