

CONTROLE BIOLÓGICO "IN VITRO" DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS PELO USO DE ACTINOMICETOS*

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.

ELY CAVALCANTI DA SILVA

Prof. Adjunto do Depto. de Antibióticos da Univ. Fed. de Pernambuco (UFPE).

KÊSIA XISTO DA F. R. DE SENA

Prof. Assistente do Depto. de Antibióticos da UFPE.

MARIA SALOME A. S. DE ANDRADE

Prof. Assistente do Depto. de Antibióticos da UFPE.

Foram testadas 200 cepas de actinomicetos, isolados a partir de solos procedentes da Bahia, Paraíba e Pernambuco, quanto a sua ação inibitória para as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (AT), *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (CMM), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *Pseudomonas solanacearum* (PS), *P. syringae* pv. *syringae* (PSS), *P. syringae* pv. *tomato* (PST) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC). A atividade antagonista foi detectada pelos métodos, bloco de gelose e prova de disco. Utilizando-se como parâmetro o diâmetro do halo de inibição. Dentre as cepas estudadas, 74 apresentaram antibiose contra as bactérias AT, CMM, PSS, XCC, ECC e PS, sendo que estas foram sensíveis a respectivamente 23, 13, 13, 10, 8 e 7 cepas, com média de diâmetros de halos de inibição variando de 18 a 41,5 mm. Nenhum dos actinomicetos testados apresentou antibiose para a bactéria PST.

INTRODUÇÃO

As principais bacterioses de plantas que ocorrem no Estado de Pernambu-

* Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, 1988.

co são: Murcha bacteriana das solanáceas, podridão mole em hortaliças, podridão negra das crucíferas e sarna da batatinha, causadas respectivamente por *Pseudomonas solanacearum* (PS), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC) e *Streptomyces* spp. (ST). Conforme Mariano et al. (1989) estas bacterioses foram encontradas no biênio 1987-1988, nas seguintes percentagens do total de fitobacterioses analisadas: 34,9; 23,8; 20,6 e 9,5.

Apesar de não estimado, calcula-se como muito elevado o total de perdas causado por estas doenças para o Estado, sugerindo a necessidade do estudo de um controle integrado, com ênfase para o controle biológico.

O controle biológico de bactérias fitopatogênicas pode ser realizado através da utilização de outras bactérias como *Pseudomonas* spp. fluorescentes, *Bacillus* spp. e actinomicetos.

Segundo Cook e Baker (1989) os actinomicetos devem ser melhor estudados para uso no controle biológico e bacterização, por sua maior tolerância a solos secos em relação a *Pseudomonas* fluorescentes e *Bacillus* spp. e, também, pela sua alta capacidade de produção de antibióticos.

Apesar de Cook e Baker (1989) citarem a presença de actinomicetos como componentes de solos supressivos a vários fungos fitopatogênicos, agentes de podridões de raízes, poucos são os trabalhos relacionando o uso desses organismos no controle de bactérias fitopatogênicas. Um dos primeiros resultados positivos foi obtido com o uso de *Streptomyces praecox*, no solo, contra a sarna da batatinha (Millard e Taylor, 1927). *Pseudomonas solanacearum* foi controlada em batata-doce, na percentagem de 70 a 80, 2% pelo uso de *Streptomyces*, isolado Nonkang 321, "in vitro" e "in vitro" (Gao, Lin e Fang, 1986). Drummond e Gomide (1983) erradicaram *P. solanacearum* de solo cultivado com batata pelo uso de doses maciças de esterco de curral e de *Streptomyces chromogenes* em várias formulações.

O objetivo deste trabalho foi selecionar actinomicetos antagonistas a diferentes bactérias fitopatogênicas, entre as quais, algumas das mais importantes em Pernambuco, PS, ECC e XCC, com a finalidade de utilização em controle biológico, dentro de um controle integrado. Resultados preliminares foram publicados por Silva e Mariano (1988).

MATERIAL E MÉTODO

Amostras de solo foram coletadas em diversos locais dos Estados de Bahia, Paraíba e Pernambuco, trazidas ao laboratório e processadas para o isola-

mento de actinomicetos, os quais foram preservados por liofilização, no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

As bactérias fitopatogências foram obtidas da coleção do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para a detecção de antagonismo foi realizada uma seleção prévia utilizando-se o método bloco de gelose (Ichikawa, Ishikura e Ozaki, 1971) e, em seguida, o teste definitivo pela prova de disco (Waksman e Lechevalier, 1962).

No primeiro método, a suspensão de esporos dos actinomicetos, foi obtida e colocada em placa de Petri adicionando-se, em seguida, 12 ml de meio de cultura ISP2 (extrato de levedura 4,0g; extrato de malte 10,0g; dextrose 4,0g; agar 18,0g; água destilada 1000ml; pH 7,2) fundente. Após homogeneização e resfriamento, as placas foram incubadas a 30°C durante sete dias, seguindo-se o corte de discos com 10 mm de diâmetro, utilizando-se um furador de rolha esterilizado. Estes discos foram colocados no centro de placa de Petri, contendo o meio NYDA (extrato de carne 3,0g; peptona 5,0g; dextrose 10,0g; extrato de levedura 5,0g; agar 18,0g; água destilada 1000ml), sobre o qual havia sido espalhada, com auxílio de isopo, a suspensão da bactéria fitopatogênica, na concentração de 10^8 ufc/ml. A incubação foi feita por 48 horas, a 30°C, e a leitura realizada, medindo-se o diâmetro do halo de inibição, em mm.

Na prova de disco, os actinomicetos foram inoculados em Erlenmeyers contendo o meio MPE (farinha de soja 20,0g; glicose 20,0g; CaCO_3 2,0g e NaCl 5,0g; pH 6,5 a 7,0). Após 72 horas, em agitador mecânico, a 200 r.p.m., a temperatura ambiente, a suspensão foi utilizada para embebedimento de discos de papel de filtro com 9 mm de diâmetro. Estes discos foram colocados em placas de Petri, com NYDA contendo a bactéria. A incubação e leitura foram realizadas conforme descrito para o método do bloco de gelose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do grande número de actinomicetos testados, apenas 74 apresentaram antibiose contra seis das sete bactérias estudadas, quais sejam AT, CMM, ECC, PSS, XCC e PS. Os halos de inibição variaram de 18,0 a 41,5 mm.

Embora não tenham sido encontrados relatos, sobre a utilização de actinomicetos, no controle de ECC ou PSS, Xu e Gross (1984b) obtiveram o controle de ECC em batata pelo uso de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, dentre elas a *P. putida* (Xu e Gross, 1984a).

Sete dos actinomicetos testados foram eficientes contra PS, o que concorda com os relatos sobre o controle desta bactéria através do uso de *Streptomyces*

praecox (Millard e Taylor, 1927), *S. griseochromogenes* (Drummond e Gomide, 1983) e *Streptomyces* spp., isolado Nonkang 321 (Gao, Lin e Fang, 1986).

Dez cepas apresentaram antagonismo contra XCC. Embora o controle desta bactéria não tenha sido relatado através do uso de actinomicetos, Habter e Alexander (1975) a controlaram pelo uso de protozoários.

Nenhum dos actinomicetos testados foi antagonico a PST. Existem relatos de que esta bactéria pode ser controlada pelo uso de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Coling, Pussemier e Diouf, 1985).

Na Tabela 1 observa-se a comparação da antibiose produzida por 23 isolados de actinomicetos contra At, em relação à testemunha. A análise estatística mostrou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey. O isolado 12427 apresentou melhor inibição "in vitro" contra essa bactéria. Apesar do controle biológico de At ser feito comercialmente, em alguns países, pelo uso da *A. radiobacter* strain k84 (Kerr e Tate, 1984) e mais recentemente pelo strain k1026 (Jones e Kerr, 1989), alguns autores têm sugerido e buscado outras alternativas de controle biológico, pela utilização de bactérias, fungos, actinomicetos e outros biocontroladores. Canfields e Moore (1986) observaram que a *A. radiobacter* k84 não foi capaz de controlar AT em plântulas de maçã, mas observaram redução do número e tamanho de galhas, em plantas de tomate, quando co-inocularam *Pseudomonas* spp. fluorescentes e AT na razão de 10:1 ufc/ml.

A Tabela 2 apresenta a antibiose produzida por treze isolados de actinomicetos contra CMM, em comparação com a testemunha. A análise estatística mostrou diferença significativa ao nível de 1% pelo teste de Tukey. Os isolados 12333 e 12530 destacaram-se como os melhores inibidores desta bactéria "in vitro".

A Tabela 3 apresenta a antibiose produzida por oito isolados de actinomicetos contra ECC em comparação com a testemunha. A análise estatística mostrou diferença significativa ao nível de 1%, pelo teste de Tukey. Os isolados 12472, 13157 e 13285 destacaram-se como os melhores inibidores desta bactéria "in vitro".

A Tabela 4 compara a ação de sete isolados de actinomicetos contra PS, em relação à testemunha. A análise estatística mostrou diferença significativa ao nível de 1%, pelo teste de Tukey. Os isolados 12966, 13427 e 11558 destacaram-se como os melhores inibidores desta bactéria "in vitro".

A Tabela 5 demonstra a antibiose produzida por treze isolados de actinomicetos contra PSS, comparando-os à testemunha. A análise estatística mostrou

diferença significativa ao nível de 1%, pelo teste de Tukey. Os isolados 12124, 12427 e 12098 destacaram-se como os melhores inibidores desta bactéria "in vitro".

Na Tabela 6 observa-se o efeito de dez isolados de actinomicetos contra XCC, em comparação com a testemunha. A análise estatística mostrou diferença significativa ao nível de 1%, pelo teste de Tukey. Os isolados 12333, 12352 e 12087 destacaram-se como os melhores inibidores desta bactéria "in vitro".

TABELA 1 - Efeito antagônico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Agrobacterium tumefaciens*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO ¹ (mm)
12427	ITABUNA-BA	30,0 a
12113	"	27,5 ab
12950	"	26,0 abc
12112	"	25,0 bcd
12976	"	24,0 bcde
13420	"	24,0 bcde
13402	RECIFE-PE	21,5 cdef
11558	TORITAMA-PE	21,0 def
12364	ITABUNA-BA	21,0 def
11584	PESQUEIRA-PE	20,5 def
12370	ITABUNA-BA	20,5 def
13404	RECIFE-PE	20,5 def
12116	ITABUNA-BA	20,0 ef
12124	"	20,0 ef
12135	"	20,0 ef
12177	ALHANDRA-PB	20,0 ef
12333	ITABUNA-BA	20,0 ef
13401	RECIFE-PE	20,0 ef
12512	ITABUNA-BA	20,0 ef
12960	"	20,0 ef
12966	"	20,0 ef
12098	"	19,5 ef
12472	"	18,0 f
TESTEMUNHA	-	9,0 g

C.V. = 6,397%

D.M.S. (1%) = 4,935

¹ Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 2 - Efeito antagônico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO ¹ (mm)
12333	ITABUNA-BA	30,5 a
12530	"	27,0 ab
9624	RECIFE-PE	25,0 bc
12361	ITABUNA-BA	25,0 bc
12472	"	25,0 bc
12512(1)	"	25,0 bc
12064	"	24,5 bc
7698	RECIFE-PE	22,5 cd
12124	ITABUNA-BA	22,5 cd
12112	"	21,0 cde
13011	"	20,0 de
13056	"	20,0 de
12261	ALHANDRA-PB	18,0 e
TESTEMUNHA	-	9,0 f

C.V. = 5,178%

D.M.S. (1%) = 4,130

¹ Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 3 - Efeito antagônico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO ¹ (mm)
12472	ITABUNA-BA	25,0 a
13157	"	25,0 a
13285	ARARIPINA-PE	24,0 ab
13254	"	20,5 bc
13276	"	20,0 bc
13277	"	20,0 bc
13119	ITABUNA-BA	20,0 bc
13094	"	19,0 c
TESTEMUNHA	-	9,0 d

C.V. = 6,151%

D.M.S. (1%) = 4,378

¹ Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 4 - Efeito antagônico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Pseudomonas solanacearum*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO ¹ (mm)
12966	ITABUNA-BA	25,0 a
13427	"	23,5 ab
11558	TORITAMA-PE	23,0 ab
13402	ITABUNA-BA	21,0 b
13420	"	20,0 b
12956	"	20,0 b
12964	"	20,0 b
TESTEMUNHA	-	9,0 c

C.V. = 5,538%

D.M.S. (1%) = 3,925

¹ Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 5 - Efeito antagônico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO ¹ (mm)
12124	ITABUNA-BA	41,5 a
12427	PASSIRA-PE	35,0 b
12098	ITABUNA-BA	29,5 c
12533	"	29,5 cd
12355	"	28,0 cde
12353	"	25,0 def
11558-7	TORITAMA-PE	24,5 ef
12050	ITABUNA-BA	22,5 fg
12112	"	21,0 fg
7698	RECIFE-PE	20,0 g
12364	ITABUNA-BA	20,0 g
12512	"	20,0 g
12536	"	20,0 g
TESTEMUNHA	-	9,0 h

C.V. = 5,087%

D.M.S. (1%) = 4,444

¹ Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 6 - Efeito antagonístico, "in vitro", de actinomicetos, contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, medido através do halo de inibição, pela prova de disco

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	HALO 1(mm)
12333	ITABUNA-BA	30,0 a
12352	"	30,0 a
12087	"	29,5 a
12124	"	26,5 b
12153	"	24,5 bc
12306	"	24,5 bc
12098	"	23,0 cd
13383(2)	SANTA RITA-PB	21,0 de
12085	ITABUNA-BA	19,5 e
12127	"	19,0 e
TESTEMUNHA	-	9,0 f

C.V. = 3,482%

D.M.S. (1%) = 2,862

1 Médias de 3 repetições por tratamento, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

ABSTRACT

A total of 200 actinomycetes isolated from soils of Bahia, Paraíba and Pernambuco, states of Brazil, were tested against the following phytopathogenic bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (AT), *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (CMM), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *Pseudomonas solanacearum* (PS), *P. syringae* pv. *syringae* (PSS), *P. syringae* pv. *tomato* (PST) and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC). The antibiosis was detected by the agar piece and disc methods by using the halo inhibition parameter. Among the studied actinomycetes, 74 showed antibiosis against At, CMM, PSS, XCC, ECC and PS. These bacteria were sensible to respectively 23, 13, 13, 10, 8 and 7 different isolates, with halo diameter varying from 18 to 41,5 mm. None of the tested isolates presented antibiosis against PST.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - CANFIELD, M. L.; MOORE, L. W. Antagonism of fluorescent pseudomonads to *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from apple. *Phytopathology*, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1135, 1986.
- 2 COLIN, J.; PUSSMIER, L.; DIOUF, A. M. Demonstration and application of the antagonism of fluorescent *Pseudomonads* spp. towards phytopathogenic bacteria. *Review of Plant Pathology*, Surrey, v. 64, p. 350, 1985.

- 3 COOK, R. J.; BAKER, K. F. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. 2. ed. Minnesota : APS Press, 1989. 539 p.
- 4 DRUMMOND, O. A.; GOMIDE, A. F. Combate a murcha bacteriana da cultura da batata. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 8, n. 3, p. 628, 1983.
- 5 GAO, C. X.; LIN, C. Z.; FANG, S. M. Screening of the actinomycete str. Nonkang 321 and assessment of its inhibitory effect on sweet potato blast. *Review of Plant Pathology*, Surrey, v. 65, p. 108, 1986.
- 6 HABTER, M.; ALEXANDER, M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. *Applied Microbiology*, Washington, v. 29, n. 2, p. 159-164, 1975.
- 7 ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica*, Tchecoslovaquia, v. 16, p. 218-224, 1971.
- 8 JONES, D. A.; KERR, A. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026, a genetically engineered derivative of strain K84, for biological control of crown gall. *Plant Disease*, St. Paul, v. 73, n. 1, p. 15-18, 1989.
- 9 KERR, A.; TATE, M. E. Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiological Sciences*, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-4, 1984.
- 10 MARIANO, R. L. R.; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T. et al. Levantamento de fitobacterioses no Estado de Pernambuco, no biênio 1987-1988. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, jul. 1989. Resumo, 276.
- 11 MILLARD, W. A.; TAYLOR, C. B. Antagonism of micro-organism as the controlling fator in the inhibition of scab by green-manuring. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, v. 14, p. 202-216, 1927.
- 12 SILVA, E. C. da; MARIANO, R. L. R. Ação "in vitro" de actinomicetos contra bacterias fitopatogenicas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 112, 1988.
- 13 XU, G. W.; GROSS, D. C. Effect of antagonistic fluorescent pseudomonads on colonization of potato roots by *Erwinia carotovora* and on yield. *Phytopathology*, St. Paul, v. 74, n. 7, p. 805, July, 1984a. Abstract.
- 14 XU, G. W.; GROSS, D. C. Selection of fluorescent *Pseudomonas* strains antagonistic to *Erwinia carotovora*. *Phytopathology*, St. Paul. v. 74, n. 7, p. 805, July, 1984b. Abstract, A126.
- 15 WAKSMAN, S. A.; LECHEVALIER, H. A. *The actinomycetes*. Baltimore : W. Wilkins, 1962. v. 3: Antibiotics of actinomycetes.

Recebido para publicação em 04 de agosto de 1992.