**SELEÇÃO** *in vitro* **DE RIZOBACTÉRIAS CONTRA** *Thielaviopsis sp* **CAUSADOR DE RESINOSE EM COQUEIRO**

Aline Figueiredo Cardoso¹; Aline Chaves Alves²; Cássia Cristina Chaves Pinheiro³; Paulo Manoel Pontes de Lins4; Gisele Barata da Silva5

 Agrônoma e Doutoranda em Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. aline\_f\_cardoso@hotmail.com;

² Acadêmica em Engenharia Ambiental. Universidade Federal Rural da Amazônia. lain\_th@hotmail.com;

³Acadêmica de Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. cassiapinheiro002@gmail.com;

4Drº em Agronomia. Fazenda Reunidas Sococo. paulom@sococo.com.br

5 Drª em Agronomia (Fitopatologia). Universidade Federal Rural da Amazônia. giselebaratasilva@gmail.com

**RESUMO**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira muito cultivada no Brasil. A cultura desta planta pode ser acometida por diversas doenças que podem causar grandes perdas na produção, como a resinose, causada pelo patógeno *Thielaviopsis* *paradoxa*. Uma alternativa para o controle da doença está na utilização de microrganismos. A primeira etapa consiste na seleção de *in vitro* de microrganismos antagônicos ao patógeno. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de rizobactérias com ação antagônica sobre *Thielaviopsis* sp*. a* obtidas de plantios comerciais de coqueiro. O método utilizado foi o pareamento direto, onde foram colocados discos de micélio de *Thielaviopsis* sp. em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e foram riscadas as rizobactérias em lados opostos e equidistantes das placas de Petri, e mantidas incubadas em temperatura ambiente (25ºC) com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições, utilizando-se três isolados de rizobactérias do coqueiro (R09, R40 e R43) e o tratamento controle (discos somente com meio de cultura). As médias foram comparadas pelo teste de SNK (p-valor≤0,05) e foram calculados o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição do crescimento radial (PICR). Todos os isolados reduziram o crescimento micelial de *Thielaviopsis* sp*.*, com destaque para R09 e R40 que também apresentaram significativos valores de PICR em 30,50 e 26,88%, respectivamente. Os isolados testados são promissores no controle resinose em campo. Os estudos de controle biológico da doença de devem avançar para a casa de vegetação para avaliar a redução da severidade da resinose *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*. Biocontrole. Crescimento micelial.

**Área de Interesse do Simpósio**: Agronomia

1. **INTRODUÇÃO**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta de clima tropical cultivada em várias regiões do Brasil, principalmente no Norte e Nordeste (JESUS JUNIOR *et al*., 2013). As variedades cultivadas são as de coqueiro anão e coqueiro gigante (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011), cujo cultivo tem importância econômica e social pois é fonte de emprego e renda, além de ser possível obter vários produtos a partir de sua exploração pela indústria alimentícia (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011) e pela indústria da moda, através da utilização das fibras do coco verde em produtos como vestuário, moveis e calçados (MARTINS *et al*., 2013).

O cultivo do coqueiro pode ser acometido por várias doenças, dentre as quais está a resinose, registrada no Brasil pela primeira vez em 2004, em Sergipe, e até o momento sem métodos eficazes para o seu controle. O agente etiológico causador da doença é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn., que provoca o encurtamento das folhas novas e a presença de resina na estipe e manchas amarronzadas ou enegrecidas no tronco (COSTA-CARVALHO *et al*., 2011).

A rizosfera é considerada importante ambiente de interação planta-microrganismo, que corresponde a uma vasta gama de atividades que podem beneficiar o desenvolvimento das plantas (MARCONDES *et al.,* 2010). Na rizosfera destacam-se as rizobactérias, conhecidas pelo seu potencial como promotoras de crescimento em plantas (PGPRs). Atualmente é discutido seu potencial como agente de controle biológico sobre fitopatogênicos (MOREIRA; ARAUJO, 2011), atuando na produção de antibióticos, competição por nutrientes e espaço (MARIANO *et al*., 2004).

Assim, entendendo a importância das rizobactérias e seu potencial como agente de biocontrole, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de rizobactérias com ação antagônica sobre o fungo *Thielaviopsis* sp*.* causador de resinose em plantas de coqueiro.

1. **MATERIAL E MÉTODOS**
	1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Proteção de Plantas-LPP, localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA, no campus de Belém, Pará.

* 1. OBTENÇÃO DO ISOLADO DE *Thielaviopsis* sp*.*

Amostras de estirpe da planta apresentando sintomas de resinose foram coletados na Fazenda Reunidas Sococo, que pertence a SOCOCO S/A agroindústrias da Amazônia localizada no município de Santa Isabel, Pará. As amostras foram levadas para laboratório e realizados isolamentos direto, onde as amostras foram desinfestadas com álcool a 70%, hipoclorito a 2% seguido de enxague com água estéril. Após este processo, as amostras foram colocadas em câmara úmida, caixas do tipo Gerbox, forradas com papel filtro estéril e umedecidos com água estéril, por 24 horas. Amostras de micélio foram coletados e cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), e mantidos em temperatura de 25ºC, até ser observado o crescimento micelial das colônias (BARNET; HUNTER, 1972). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes para identificação até gênero com auxílio de microscópio Olympus X21.

* 1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIA

 Foram coletadas sete amostras de solo rizosférico de plantios comerciais de coqueiro, e posteriormente realizado o procedimento de diluição seriada para todas as amostras, ao qual foram adicionados 90 mL de água destilada esterilizada a 10g de solo em recipiente esterilizado e levado a mesa agitadora (Incubadora “*shaker*”, modelo MAA-420, Marconi), por 20 minutos a 114 rpm. Uma alíquota de 1mL do sobrenadante da amostra original foi adicionada a 9mL de água destilada esterilizada em tubo de vidro (diluição a -1), sendo homogeneizado com uso de vórtex, sendo retirados 1mL e adicionados em outros 9mL (diluição a -2), até 10-3. cada diluição, alíquotas de 20 μL foram inoculadas em triplicatas em placas de Petri com meio de cultura 523 proposto por Kado e Heskett (1970). As placas foram em seguida incubadas em BOD à temperatura de 28 ± 2ºC, com fotoperíodo de 12h (claro/escuro) até que o aparecimento de colônias fosse detectado. As colônias obtidas foram selecionadas aleatoriamente e estriadas em placas de Petri com o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento. Depois de confirmada a pureza das culturas, os isolados bacterianos foram preservados em tubos de 1,5mL, contendo água e glicerina, na proporção 1:1.

* 1. ANTAGONISMO: PAREAMENTO

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, três isolados de rizobactérias do coqueiro (R09, R40 e R43) e tratamento controle apenas com *Thielaviopsis* sp, e cinco repetições. Foram utilizadas placas de Petri, esterilizadas na câmara de fluxo, contendo meio de cultura BDA. Ainda na câmara de fluxo foram colocados em um lado das placas de Petri discos de micélio (Ø=5 mm) de *Thielaviopsis* sp, e em seguida foram riscados os isolados de rizobactéria no lado oposto e equidistante de onde foi colocado o disco de micélio do patógeno. As placas foram mantidas em uma bancada em temperatura ambiente (± 25ºC), para serem avaliadas.

* 1. AVALIAÇÕES

As avaliações foram feitas através de medições diárias do diâmetro da colônia de *Thielaviopsis* sp*.*, utilizando uma régua milimetrada. O procedimento foi realizado até o crescimento micelial no tratamento controle ocupasse todo diâmetro da placa de Petri. Os dados coletados durante a avaliação foram utilizados para calcular o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), dada pela formula IVMC=D–Da/N adaptada de Oliveira (1991), onde D é igual ao diâmetro atual da colônia, Da é o diâmetro do dia anterior e N é o número de dias após o início do experimento. Também foi avaliada a porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Thielaviopsis* sp*.* em relação ao tratamento controle, proposto por Ezziyyani *et al*. (2004) segundo a fórmula PICR = R1–R2/R1 onde o PICR = % de inibição de crescimento micelial, R1=Raio do tratamento controle e R2= Raio do tratamento.

* 1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos apresentaram distribuição normal e foram submetidos à Análise de Variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (p-valor≤0,05), utilizando-se o programa Rx65 3.5.1. (CRAN, 2018).

1. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos demonstraram que todos os isolados R09, R40 e R43 tiveram ação antagônica sobre o crescimento micelial do *Thielaviopsis* sp. O crescimento do patógeno na presença das rizobactérias R40, R43 e R09 foram de 1,46, 1,32 e 1,29 cm, respectivamente, enquanto o tratamento controle teve crescimento de 2,16 cm (Figura 1).

**Figura 1**- Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). IVCM de rizobactérias de rizosfera de plantios comerciais de coqueiro sobre *Thielaviopsis* sp*.* (A). Pareamento entre o *Thielaviopsis* sp*.* (A) e os isolados de rizobactérias, tratamento B (R43), tratamento C (R40) e tratamento D (R09) (B). \*Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK)(p ≤ 0,05).

1.  (B)

Fonte: Os autores.

O isolado que resultou em maior PICR médio do patógeno foi R9, com 30,5%, seguido do isolado R40 que apresentou 26,88% (Tabela 1).

**Tabela 1**. Percentual médio de inibição do crescimento radial (PICR) de isolados de rizobactérias isolados de plantios comerciais de coqueiro sobre *Thielaviopsis* sp*. \**Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (p ≤ 0,05).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|

|  |
| --- |
| **Isolados de Rizobactéria** |

 | **PIRC%** |
| **R09** | 30,50 a |
| **R40** | 26,88 a |
| **R43****CV (%)** | 22,75 b13.76 |

Fonte: Aline C. Alves, 2018

 A ação antagônica das rizobactérias sobre o patógeno pode ter relação com a produção de algumas substâncias capazes de inibir o crescimento micelial do fungo, segundo Lima *et al.* (2014). Algumas rizobactérias podem produzir bacteriocinas, enzima inibidora quitinase e antibiose; e também poderiam ser capazes de competir por nutrientes num ambiente controlado, como no teste de pareamento (PELZER *et al*., 2011). Em campo, o antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL *et al*., 2008).

Resultado semelhante foi demostrado por Freire *et al*. (2016), utilizando isolados de rizobacteria do bacurizeiro como antagonistas ao *Lasiodiplodia sp*, com porcentagens de inibição de crescimento micelial chegando a 23,30% dentre os 23 isolados de rizobactéria avaliados no teste, já George *et al*. (2012), em um teste de antagonismo entre *Thielaviopsis paradoxa* contra rizobactérias *Pseudomonas* de coqueiro os resultados chegaram a mais de 60% de inibição de crescimento micelial, foram 16% de 156 isolados testados, 12 dos 13 isolados considerados eficientes produziram sideróforos, confirmando a competição por ferro e outros nutrientes no ambiente controlado.

1. **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos no teste de antagonismo demostraram que todos os isolados (R09, R40 e R43) do experimento foram eficientes no controle biológico do *Thielaviopsis* sp*.*, demonstrando sua possível eficácia no tratamento da resinose e necessidade de ampliar os estudos de controle biológico para casa de vegetação, visando avaliar o comportamento destes isolados em experimentos *in vivo*.

**5. AGRADECIMENTOS**

 À Universidade Federal da Amazônia, ao Laboratório de Proteção de Plantas, a Fazenda Reunidas Sococo (SOCOCO Agroindústria da Amazônia) e FAPESPA.

**REFERÊNCIAS**

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3. ed. Minneapolis, Minnesota: **Burgess Publishing**, 241 p.1972.

COSTA-CARVALHO, C. R. R. da; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe. **Scientia plena**, 2011.

CRAN, disponível em:<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/> acesso em 02 de novembro de 2018.

EZZIYYANI, M.; PÉREZ, S. C.; REQUENA, M. E.; RUBIO, L.; CANDELA, M. E. Biocontrol por Streptomyces rochei (Ziyani), de la podre dumbre del pimiento (Capsicum annuum L.) causada por Phytophthora capsici. **Anales de Biología**, n.26, p.69-78, 2004.

FREIRE, A. et al. Rizobactérias do bacurizeiro no biocontrole de Lasiodiplodia sp. In: Embrapa Amazônia Oriental**-Artigo em anais de congresso (ALICE).** In: Seminário de iniciação científica, 20.; seminário de pós-graduação da Embrapa Amazônia oriental, Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

GEORGE, P. et al. Antagonismo in vitro de pseudômonas fluorescentes rizosféricas de coco contra Ganoderma applanatum e Thielaviopsis paradoxa, patógenos fúngicos do coco. **Journal of Plantation Crops** , v. 40, n. 2, p. 75-81, 2012.

JESUS JUNIOR, L. A; TOMMASI, A. C; OLIVEIRA JUNIOR, A. M; RUSSO, S. L. Análise da produção de coco no estado de Sergipe frente ao crescimento da cultura no nordeste do Brasil. **Revista Geintec**. ISSN 2237-0722, vol.3, Sergipe, 2013.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology**, St. Paul,v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LIMA, D. R. O et al. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, 2014.

MARCONDES, J et al. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, v. 1, n. 1, 2010.

MARTINS, R. C; JESUS JUNIOR, L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010– Aracaju**. Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2011. 28 p. il.; color. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 164).

MARTINS, A. P. et al. Aproveitamento de fibra de coco verde para aplicabilidade têxtil. **Redige**, v. 4, n. 2, p. 111-16, 2013.

MARIANO, R. L. R; ASSIS, G. B; NASCIMEMTO, A. R. P; DONATO, V. M. T. S. Importância das bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças para uma agricultura sustentável. **Anais da academia Pernambucana de ciência e agronomia**. Vol. 1, p89-111, Recife, 2004.

MOREIRA, A. L. L; ARAUJO, F. F. Produção de fosfatase, enzima ACC Desaminase e antagonismo a fitopatógeno por rizobacterias. **Colloquium Agrariae**. Vol.7. Presidente Prudente, 2011.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.), p. 111, 1991. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – **Escola Superior de Agricultura de Lavras**, Lavras, 1991.

PELZER, G. Q. et al. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2010.