**SELEÇÃO** *in vitro* **DE RIZOBACTÉRIA CONTRA** *Thielaviopsis paradoxa* **CAUSADOR DE RESINOSE EM COQUEIRO**

Aline Figueiredo Cardoso1; Ana Karoliny Alves Santos2; Cássia Cristina Chaves Pinheiro3; Paulo Manoel Pontes Lins4; Gisele Barata da Silva5

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

2 Acadêmica de Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. karol.ine20@hotmail.com

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

4 Engº Agrº, Superintendente da empresa Socôco S.A Agroindústrias da Amazônia. pmplins@uol.com.br

5 Drª, Professora de Microbiologia. Universidade Federal Rural da Amazônia. giselebaratasilva@gmail.com

**RESUMO**

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é a palmeira de maior importância mundial, sendo fonte de matérias-primas para inúmeros produtos. Um dos principais problemas relacionados à cultura são os fitossanitários. Dentre as doenças que ocorrem à cultura do coqueiro a resinose, causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* se mostra uma doença de grande importância econômica. O uso de controle biológico por microrganismos é uma alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos. O objetivo deste estudo foi selecionar isolados de rizobactériascom ação antagônica sobre *T. paradoxa*, utilizando o método de pareamento. Discos de micélio do patógeno e o isolado de rizobactéria foram dispostos equidistantes em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e mantidos em temperatura de 25ºC e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições, utilizando três isolados de rizobactérias (32113, 32111 e R92) e o tratamento controle (disco somente com meio de cultura). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (p-valor≤0,05), no programa SISVAR. Dentre os isolados destacamos a BRM-32113 que inibiu o IVCM em 22,89% e em 23% comparada ao controle. Os estudos de controle biológico da doença com rizobactérias mostraram resultados promissores e devem avançar para a casa de vegetação para avaliar a redução da severidade de resinose em coqueiro.

**Palavras-chave:** Biocontrole. Antagonismo. *Cocos nuficera*

**Área de Interesse do Simpósio**: Agronomia.

**INTRODUÇÃO**

 O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é a palmeira de maior importância mundial, sendo fonte de matérias-primas para inúmeros produtos, quer sejam industriais ou artesanais (FONTENELE, 2005; TAVARES, 2010). Um dos principais problemas relacionados a cultura desta palmeira são os fitossanitários (COSTA *et al*., 2002). Dentre as doenças que ocorrem à cultura do coqueiro, a resinose cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn. (anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau), é uma doença de grande importância econômica. As plantas infectadas apresentam exsudação de seiva que escorre por fissuras no estipe. Na região interna do estipe verificam-se extensas lesões amarronzadas e nas raízes ocorrem lesões necróticas prejudicando a absorção e/ou translocação de água e nutrientes do solo até as folhas (WARWICK *et al*., 2004).

O controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos. A diversidade destes, bem como suas relações antagônicas, se mostram como importante ferramenta para o controle biológico aplicado (ROMEIRO *et al*., 2005; HALFELD-VIEIRA *et al*., 2006).

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* estão entre as mais estudadas quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole (LASLO *et al*., 2012), sendo generosas espécies de bactérias antagonistas de maior prevalência: *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putidae*, *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA *et al.*, 2008).

 Com isso o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de rizobactérias no controle “*in vitro*” de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de folhas sintomáticas de coqueiro.

**MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Proteção de Plantas-LPP da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA (1°27'31" S e 48°26'04.5" O). As amostras de folhas sintomáticas de coqueiro foram coletadas da Fazenda Reunidas Sococo localizada no município de Santa Isabel – PA (1°13’26” S e 48°02’29” W).

**Obtenção do patógeno**

O isolamento foi realizado de forma indireta utilizando amostras foliares com sintomas do ataque do patógeno. As amostras foram lavadas com água corrente e sabão, em seguida foram cortadas em pequenos fragmentos do material para que pudesse ser realizado o isolamento. Para isso utilizou-se álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio (1 minuto) e água destilada autoclavada. Após o procedimento as amostras foram colocadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), no qual as colônias foram mantidas em temperatura ambiente com fotoperiodo de 12h até que fossem identificadas estruturas de reprodução do patógeno (BARNET; HUNTER, 1972).

**Obtenção de isolados de rizobactérias**

Os isolados de *Pseudomonas fluorescens* (32111)e *Burkholderia pyrrocinia* (32113)fazem parte da coleção de isolados do Laboratório de Proteção de Plantas-UFRA, e foram isoladas de rizosfera de plantas de arroz. O isolado R92 foi isolado de rizosfera de açaí (KADO; HESKETT, 1970).

**Delineamento Experimental**

Para avaliar o antagonismo de rizobactérias e *T. paradoxa* utilizou-se placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Em cada placa foram colocados discos de micélio do patógeno, com 8 mm de diâmetro. Com o auxilio de uma alça de platina contendo colônias de rizobactérias foi feito um risco estriado na extremidade oposta ao patógeno. Para o tratamento controle foram colocados discos de micélio do patógeno nas placas, contendo meio BDA, e não foi feito o risco na extremidade da placa com a cultura antagonista.

As placas foram mantidas em câmaras do tipo B.O.D, as quais foram incubadas em temperatura de 28C° com fotoperíodo alternado (12h claro e 12h escuro) durante quatro dias. O experimento foi realizado com quatro tratamentos (rizobactérias – 32111, 32113, R92 e patógeno) e cinco repetições.

**Analise estatística**

Os dados obtidos foram utilizados no cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991), onde IVCM = Ʃ (D – Da)/N, sendo D= diâmetro médio atual da colônia; Da= diâmetro médio da colônia no dia anterior e N= número de dias após a inoculação.

 Foi avaliada a porcentagem de inibição de crescimento micelial em relação proposto por Ezziyyani (2004), segundo a formula PICR = R1 – R2/R1. Onde o PICR= % de inibição de crescimento micelial, R1= Raio do tratamento controle e R2= Raio do tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições, em arranjo fatorial 4×5. A análise estatística de variância e as médias de crescimento foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (p-valor≤0,05).

**RESULTADO E DISCUSSÃO**

 Dentre os isolados testados a BRM-32113 foi o que obteve melhor resultado quanto à inibição *in vitro* no IVCM com 2,93 cm, enquanto o controle apresentou 3,96 cm (Figura 1). Na inibição do crescimento micelial (PICR), BRM-32113 apresentou melhor resultado com 22,89% (Tabela1). A eficiênciana atividade “*in vitro”* apresentada por rizobactérias estáassociada à capacidade que essas bactérias têm em produzirantibióticos capazes deatuar na inibição do crescimento micelial de fungos (MORADI *et al*., 2012). A ação antagônica também é dependente do meio de cultura utilizado, havendo substâncias que possuem a capacidade bacteriocinogênica e a habilidade de inibição em condições de laboratório (FUTUYA *et al.*, 1991).

**Figura 1-** Crescimento micelial do *T. paradoxa* em cultivo pareado *in vitro*, com rizobactérias. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (p ≤ 0,05).

a

**Tabela 1-** Inibição do crescimento micelial (%) do *T. paradoxa* na presença do rizobactérias. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (p ≤ 0,05).

|  |  |
| --- | --- |
| Tratamentos | Antagonismo |
| **PICR (%)** |
| BRM-32113 | **22,89 b** |
| BRM-32111 | **0,00 a** |
| R 92 | **0,00 a** |
| CONTROLE | **0,00 a** |
| CV (%) | **17,55** |

**CONCLUSÃO**

 O estudo de controle biológico de *T. paradoxa* com a utilização de rizobactérias (especialmente o isolado BRM-32113) apresentou resultados promissores no controle da doença *in vitro* e devem avançar para a casa de vegetação para avaliar a redução da severidade de resinose em coqueiro.

**AGRADECIMENTOS**

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

**REFERÊNCIAS**

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

CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

COSTA, J. L. DA S; OLIVEIRA, V. C. DE; VIANA, F. M. P.; LEAL, E. C.; WARWICK, D. R. N. **Aprimoramento do conhecimento científico e desenvolvimento de tecnologias para o controle das principais doenças do coqueiro**. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 121p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 39), 2002.

EZZIYYANI M. 2004. **Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento** (*Capsicum annuum* L.) **mediante uma combinación de microorganismos antagonistas**. Murcia: Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

FONTENELE, R. E. S. Cultura do Coco no Brasil: **Caracterização do Mercado Atual e Perspectivas Futuras**. In: XLIII congresso da sober, Ribeirão Preto. Instituições, eficiência, gestão e contratos no sistema agroindustrial: Anais. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, p. 1-20. 2005.

FUTUYA, N., KUSHIMA, Y., TSUCHIYA, K. *et al*. Protection of tomato seediing by pre-treatment with *Pseudomonas gliimae* from infection with Pseudomonas solanacearum and its mechanisms. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 57, n. 3, p. 363-370, 1991.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.41, p.1247-1252, 2006.

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.

LASLO, E.; GYÖRGY, E.; MARA, G.; TAMÁS, E.; ÁBRAHÁM, B.; LÁNYI, S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potencial microbial inoculants. **Crop Protection**, v. 40, p. 43-48, 2012.

MORADI, H. *et al*. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus* *subtillis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant** **Omics Journal**, v.5, n.2, p.68-74, 2012.

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

ROMEIRO, R.S.; LANNA-FILHO, R.; VIEIRA, J. R.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA,

M. C.; CARVALHO, M. G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.120-123. 2005.

TAVARES, F. F. M. Pós-coco: **Agregação de valor na cadeia produtiva do coco verde**. ESPM-SP. 14p. 2010.

WARWICK, D. R. N.; FERREIRA, J. M. S.; PASSOS, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro provocada por *Chalara paradoxa* em Sergipe. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.29, n.4, p.413, 2004.