

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BACTÉRIAS ANTAGONISTAS COMO POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE CONTRA *Ralstonia solanacearum*

Vanessa Sessa Dian¹, Lincoln Xavier Correa¹, Gabriel Mendes Ribeiro¹, Pedro Henrique de Paula¹, Serli de Oliveira Cabral¹, Dalila da Costa Gonçalves¹, André da Silva Xavier¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Campus Alegre, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000- Alegre - ES, Brasil, vanessasessa2@gmail.com, lincolnxavier229@gmail.com, gabrielmendes0069@gmail.com, pedro1901ze@gmail.com, biologiaserli@gmail.com, dalilant@hotmail.com, andre.s.xavier@ufes.br.

Resumo

A murcha bacteriana é uma doença que atinge mais de 200 espécies de plantas e é causada pela fitobactéria *Ralstonia solanacearum*. Atualmente não existem medidas de controle efetivas para proteger cultivos agrícolas, necessitando desenvolver novas estratégias para fortalecer o manejo da doença. A presente pesquisa objetivou coletar, isolar e testar a atividade antagonista de diferentes bactérias contra *R. solanacearum*, visando o futuro desenvolvimento de estratégias de biocontrole da murcha bacteriana em plantas. 66 bactérias com potencial antagonista foram triadas com teste de cultura cruzada para analisar seu perfil antagonista. As que apresentaram melhor atividade, foram testadas em triplicata contra *R. solanacearum*. UFES 101, UFES 180 e UFES 182 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas fluorescens* apresentaram os melhores resultados de atividade antagonista, o que abre novos caminhos para identificar os isolados UFES 101, 180 e 182, bem como a caracterização e uso de possíveis metabólitos bacterianos produzidos por *P. syringae* pv. *tomato* e o uso de *P. fluorescens* como bactéria promotora de crescimento e antagonista à *R. solanacearum*.

Palavras-chave: Murcha bacteriana. Antagonismo bacteriano. Biotecnologia.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônômica.

Introdução

Fitopatógenos habitantes do solo infectam diversas plantas hospedeiras e causam perdas significativas nos cultivos agrícolas. Dentre eles, destacam-se neste contexto as bactérias fitopatogênicas (MARTINS *et al.*, 2018), como o Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CRS), conhecido por causar murcha bacteriana em mais de 200 espécies de plantas, como banana, tomate, batata e eucalipto (PRIOR *et al.*, 2016). Os isolados deste grupo são facilmente disseminados através de água e solos contaminados, equipamentos agrícolas e restos culturais que servem como fonte de inóculo (ÁLVAREZ *et al.*, 2022).

O ciclo da doença inicia quando com a infecção das raízes da planta hospedeira e colonização do xilema, que resulta na obstrução do sistema vascular pela secreção de exopolissacarídeos, afetando a capacidade das plantas de transportar água e nutrientes, causando murcha e morte das plantas (PRIOR *et al.*, 2016).

Devido à resistência deste grupo de patógenos aos métodos de controle existentes e ao impacto ambiental que causam, muitos agricultores têm dificuldade em controlar esta doença. Diante disso, é necessário desenvolver tecnologias assertivas para o manejo da doença, e as tendências atuais destacam o uso de microrganismos para o controle de diferentes doenças de plantas (SELLITTO *et al.*, 2021).

Diferentes microrganismos com atividade supressora contra *R. solanacearum* já foram relatados (LAHLALI *et al.*, 2022). Além disso, microrganismos capazes de combater a murcha bacteriana, aliados à promoção de crescimento para plantas têm recebido maior atenção (CHAUDHARY *et al.*, 2022).

Apesar dos muitos estudos sobre controle biológico de doenças de plantas, não existem biopesticidas comerciais disponíveis para o controle da murcha bacteriana (YULIAR *et al.*, 2015),

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

tornando necessário desenvolver um produto eficaz contra a doença, além disso alternativas mais ecológicas, como o uso de antagonistas microbianos para controlar fitopatógenos, são de grande interesse visto que ambientalmente é necessário diminuir a dependência de produtos químicos sintéticos (ELJOUNAIDI *et al.*, 2016).

A presente pesquisa objetivou coletar, isolar e testar a atividade antagonista de diferentes bactérias contra *R. solanacearum*, visando o futuro desenvolvimento de estratégias de biocontrole da murcha bacteriana em plantas.

Metodologia

O presente trabalho foi executado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre-ES, no Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA), localizado nesta instituição.

Obtenção dos isolados bacterianos

O isolado virulento de *Ralstonia solanacearum* (B73) foi obtido a partir da Coleção de Culturas Bacterianas do BIOTA (CCB-BIOTA), e as 66 potenciais bactérias antagonistas prospectadas em diferentes regiões do Estado do Espírito Santo (ES), também foram provenientes da CCB-BIOTA. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi doada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Triagem do potencial antagonista

As bactérias coletadas foram submetidas à análise de seu perfil antagonista contra *R. solanacearum* e o grau de antagonismo foi determinado pelo método de cultura cruzada (DHINGRA E SINCLAIR, 1995). *R. solanacearum* foi reativada em placa de Petri com 15 mL de meio de cultura CPG (1,5% de ágar), utilizando o método de estria composta. A placa foi incubada em estufa a 28 °C durante 48 horas. Em seguida, uma colônia isolada foi repicada em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura CPG líquido e incubada em equipamento Shaker, a 28 °C, sob agitação de 150 RPM.

A densidade óptica (OD) da bactéria foi ajustada para OD600 0,2, e 16 mL da cultura bacteriana foram adicionados em 60 mL de CPG (1,5% de ágar) fundente. 15 mL desta solução foram plaqueadas em placa de Petri de 9 cm. Em cada placa foi testada uma bactéria antagonista (OD600 0,2), com 4 repetições por placa e 3 placas para cada bactéria. No centro de cada placa foi adicionado o controle negativo composto apenas por água destilada esterilizada.

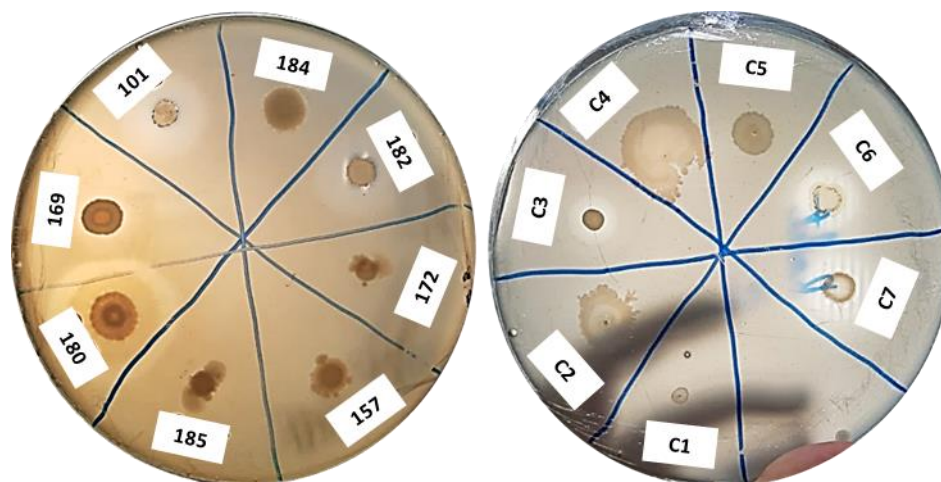
As placas foram dispostas em estufa incubadora, sob temperatura de 28 °C, durante 72 horas. Em seguida foram medidos em milímetros os halos de crescimento da bactéria antagonista e seus halos de inibição com paquímetro digital.

Resultados

Dos 66 isolados testados contra *R. solanacearum*, os isolados UFES 101, UFES 180 e UFES 182, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (C6 e C7) e *Pseudomonas fluorescens* (C3) apresentaram os melhores resultados de atividade antagonista. Os halos de inibição destes isolados são apresentados na Figura 1.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - Atividade antagonista de diferentes isolados bacterianos contra *R. solanacearum*.



Fonte: Os autores.

Discussão

O isolado UFES 101 é uma bactéria endofítica, coletada a partir de planta trepadeira presente em afloramento rochoso. Já as bactérias UFES 180 e UFES 182 foram obtidas a partir de amostras de solo. Isso mostra que bactérias antagonistas contra *R. solanacearum* podem ser encontradas em diferentes ambientes, como a rizosfera (GASHAW *et al.*, 2022).

Estudos anteriores descrevem isolados do gênero *Pseudomonas* spp. como potenciais bactérias antagonistas contra *R. solanacearum*, devido à forte atividade contra esta fitobactéria, evidenciando seu potencial uso como agente de biocontrole contra a murcha bacteriana do tomateiro (GASHAW *et al.*, 2022; KHEIRANDISH; HARIGHI, 2015). Na presente pesquisa, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas fluorescens* apresentaram forte atividade antagonista contra *R. solanacearum*. *P. fluorescens* também é conhecida como promotora de crescimento em plantas e poderia compor um coquetel microbiano, juntamente com outras bactérias antagonistas, aliando a promoção de crescimento de plantas ao combate de *R. solanacearum* (KHEIRANDISH; HARIGHI, 2015).

Já *P. syringae* pv. *tomato*, que por ser um patógeno da cultura do tomate, não poderia ser aplicado diretamente na cultura, mas uma proposta interessante seria rastrear se há produção de metabólitos bacterianos e qual (ou quais) estão associados à atividade antagonista contra *R. solanacearum*, visando futuramente o desenvolvimento e síntese de novos produtos para fortalecer o manejo da murcha bacteriana em tomateiro. Uma proposta similar a esta foi desenvolvida por Zhao *et al.* (2023).

Conclusão

Os isolados UFES 101, UFES 180 e UFES 182 *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (C6 e C7) e *Pseudomonas fluorescens* (C3) apresentaram forte atividade antagonista contra *Ralstonia solanacearum*, o que abre novos caminhos para identificação dos isolados UFES 101, UFES 180 e UFES 182, bem como a caracterização e uso de possíveis metabólitos bacterianos não-fitotóxicos produzidos por *P. syringae* pv. *tomato* que estejam envolvidos na atividade antagonista e o uso de *P. fluorescens* como bactéria promotora de crescimento e antagonista à *R. solanacearum*, como opção para incorporar a um coquetel microbiano. Os resultados desta pesquisa serão usados para direcionar novas estratégias de biocontrole contra *R. solanacearum*, visando fortalecer a produção agrícola de forma sustentável.

Agradecimentos

Ao Centro de Ciências Agrárias Engenharias e ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, nas dependências dos quais os experimentos ocorreram, o apoio da

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

ÁLVAREZ, Belén *et al.* *Ralstonia solanacearum* facing spread-determining climatic temperatures, sustained starvation, and naturally induced resuscitation of viable but non-culturable cells in environmental water. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2503, 2022.

CHAUDHARY, Ujwal *et al.* Spelling interface using intracortical signals in a completely locked-in patient enabled via auditory neurofeedback training. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1236, 2022.

DHINGRA, O.B. AND SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2. ed. CRC Press, Boca Raton, 1995.

ELJOUNAIDI, Kaouthar *et al.* Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. **Biological control**, v. 103, p. 62-68, 2016.

GASHAW, Tsigie *et al.* Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists against *Ralstonia solanacearum* causing tomato (*Lycopersicon esculentum*) wilt in central Ethiopia. **International Journal of Agronomy**, v. 2022, p. 1-9, 2022.

KHEIRANDISH, Zeinab; HARIGHI, Behrouz. Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. **Biological Control**, v. 86, p. 14-19, 2015.

LAHLALI, Rachid *et al.* Biological control of plant pathogens: A global perspective. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 596, 2022.

MARTINS, Paula MM *et al.* Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1099, 2018.

PRIOR, Philippe *et al.* Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-11, 2016.

SELLITTO, Vincenzo Michele *et al.* Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: Boundaries between pre-and postharvest applications on vegetables and fruits. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 60, 2021.

ZHAO, Qian *et al.* Antagonistic Activity of Volatile Organic Compounds Produced by Acid-Tolerant *Pseudomonas protegens* CLP-6 as Biological Fumigants To Control Tobacco Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 2, p. e01892-22, 2023.