



Artigo encontrado em revisão bibliográfica feita pelo Professor Hasime Tokeshi (Departamento de Fitopatologia – ESALQ/USP).

Tradução: Carlos Francisco Ragassi (Eng. Agrônomo – ESALQ/USP. E-mail: cragassi@gmail.com).

Revisão: Professor Hasime Tokeshi

Comparação da estrutura das comunidades bacterianas na rizosfera de plantas de tomate crescidas em solos supressivos e condutivos quanto a murcha bacteriana

Yoshitaka Shiomi, Masaya Nishiyama, Tomoko Onizyka, Takuya Marumoto
Applied and environmental microbiology. Sept. 1999. Vol 65. No 9. p. 3996-4001.

Resumo:

Em um solo chamado Mutsumi, no Japão, tem sido relatado que o crescimento de *Ralstonia solanacearum*, assim como a murcha bacteriana, são suprimidos na rizosfera do tomate. Buscando avaliar os fatores biológicos que contribuem para a supressividade, amostras desse solo foram submetidas a três tratamentos: fumigação com clorofórmio, mistura de solo autoclavado com solo Mutsumi intacto e solo autoclavado misturado com solo condutivo (Yamadai) intacto. Todos os tratamentos foram inoculados com *Ralstonia solanacearum* e, posteriormente analisados quanto a ocorrência de murcha bacteriana. A fumigação com clorofórmio aumentou a ocorrência da doença. Maior número de plantas de tomate apresentaram murcha no tratamento com mistura de solo Yamadai do que no tratamento com mistura de Mutsumi. Dessa forma, os resultados indicam que a população de microrganismos naturalmente existentes no solo Mutsumi foi significativamente capaz de reduzir a severidade de murcha bacteriana nas plantas de tomate. Para caracterizar os tipos de bactérias presentes na rizosfera, essas bactérias foram isoladas e classificadas em 22 grupos com base na comparação do polimorfismo entre seu RNA ribossômico (subunidade 16S). No solo Yamadai, um único grupo de bactérias foi extremamente predominante (73,1%), enquanto que no solo Mutsumi, a distribuição dos grupos de bactérias foi muito mais uniforme. As análises das seqüências das subunidades 16S das linhagens pertencentes aos grupos dominantes de bactérias sugeriram que bactérias gram-negativas, parentes próximas da β -proteobactéria, foram mais comuns na rizosfera do tomate. Nos experimentos realizados *in vitro*, as bactérias da rizosfera do solo Mutsumi cresceram muito mais vigorosamente sobre pectina, um dos principais exsudatos radiculares do tomate, comparado com as bactérias do solo Yamadai.

Esses resultados indicam que é difícil para o patógeno dominar em uma diversificada comunidade rizobacteriana que se desenvolve bem sobre pectina.

Introdução

Embora muitos estudos sejam realizados visando o controle de doenças, a murcha bacteriana do tomate, causada por *Ralstonia solanacearum* continua sendo comum nas regiões tropicais e subtropicais. No entanto, sabe-se que em alguns solos, a incidência dessa doença é baixa. Em uma área da cidade de Yamaguchi, no Japão, o tomate é cultivado com baixa ocorrência de murcha, apesar de ser uma área com mais de uma década sucessiva de monocultura. Sendo assim, nós começamos nosso estudo buscando determinar como a ocorrência da murcha bacteriana é suprimida nessa área. Em um estudo anterior, nós comparamos a dinâmica da população de *R. solanacearum* no solo fora da camada rizosférica, na rizosfera, nas raízes e no caule de plantas de tomate em um solo condutivo e um supressivo para murcha, ambos recém infestados com o patógeno. A sobrevivência do patógeno em solo fora da rizosfera foi melhor no solo supressivo do que no solo condutivo, enquanto que a multiplicação do patógeno na rizosfera do tomate foi melhor no solo condutivo que no supressivo. Portanto, nós deduzimos que a supressão da multiplicação do patógeno na rizosfera foi uma das razões para a baixa incidência de murcha bacteriana nesse solo supressivo.

No presente estudo, para avaliar o papel dos fatores bióticos na supressividade da murcha bacteriana do tomate, nós testamos plantas de tomate em três solos tratados. Em seguida, os tipos de bactérias presentes na rizosfera foram caracterizados com base no polimorfismo de sua seqüência da subunidade ribossomal 16S, através da técnica de RFLP (polimorfismo quanto ao comprimento de fragmentos de restrição). Além disso, o crescimento sobre pectina, que é tido como o principal exsudato radicular do tomate, e a atividade da poligalacturonase dos microrganismos rizosféricos dos solos testados foram analisados.

Materiais e Métodos:

Amostras de solo. Duas amostras de solo, Mutsumi e Yamadai, foram usados nesse estudo. Solo Mutsumi foi obtido de uma casa de vegetação comercial, localizada na cidade de Yamaguchi, em maio de 1996. O campo amostrado recebia esterco de vaca anualmente e tinha sido cultivado com tomate por oito anos consecutivos, apresentando baixa ocorrência de murcha bacteriana. O solo Yamadai foi obtido de um campo de centeio na Universidade de Yamaguchi. Ambas as amostras foram peneiradas com peneira de 4 mm e guardados à temperatura ambiente com um potencial hídrico de -25 kPa até os procedimentos seguintes. Textura, pH, carbono orgânico e nitrogênio total dos

solos estão dispostos na Tabela 1. Antes de cada experimento, as amostras de solo foram preincubadas por duas semanas a 30°C com um potencial de -6,2 kPa.

Medida da supressividade da murcha bacteriana de tomate no solo Mutsumi tratado. Solo Mutsumi foi separado em três sub-amostras e tratados como se segue a fim de modificar suas características microbiológicas. Duas das sub-amostras foram autoclavadas por 20 min a 121°C em três dias consecutivos para esterilização completa e, em seguida, misturados tanto com solo Mutsumi quanto com solo Yamadai, na taxa 9:1, com base no peso seco. A outra sub-amostra foi fumigada com clorofórmio em uma câmara de vácuo por 24 horas, pois considera-se que esse tratamento apresenta pouca influência sobre as propriedades físico-químicas do solo, diferentemente do que ocorre com a autoclavagem, no entanto, esse método não esteriliza completamente o solo.

Cada um desses solos tratados foram pré-incubados por 30 dias a 30°C com um potencial de água de -6,2 kPa em uma câmara vedada para evitar contaminação pelos microrganismos de fora. Sementes de tomate (cultivar Momotarou) foram imersas em água estéril por um dia, semeadas em recipientes contendo amostra de cada um dos tipos de solo e cultivados em uma câmara de crescimento (30°C; 12h luz, 12h escuro). Dez dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para recipientes contendo amostras dos mesmos tipos de solo, tendo sido infestadas com *R. solanacearum* linhagem SL8. Esses solos infestados foram preparados imediatamente antes do transplante, pulverizando-se uma suspensão do inóculo a 10^5 células/ml sobre a superfície do solo tratado e revolvendo-o em seguida, de forma a alcançar uma população final de aproximadamente 10^3 células/g de solo seco. Os recipientes contendo as plântulas foram mantidos em uma câmara de crescimento (30°C; 12h luz, 12h escuro). Com um potencial de água no solo mantido por volta de -6,2 kPa, adicionando-se água estéril duas vezes ao dia. O número de plantas que apresentaram murcha foi registrado durante 60 dias. As análises foram realizadas utilizando-se 16 plantas em triplicata (total de 48 plantas) por amostra de solo. Algumas das plantas que apresentaram murcha foram testadas para o agente causal da murcha do tomate cortando-se o caule a fim de se verificar a presença da suspensão branca e viscosa, característica desse patógeno. Depois disso, a suspensão foi riscada em no meio seletivo de Hara e Ono (4).

Resultados

Severidade da murcha bacteriana de tomate nos solos Mutsumi diferentemente tratados. A fim de demonstrar que a supressão da murcha bacteriana em tomate no solo Mutsumi foi devida aos organismos nele residentes, nós usamos solos fumigados com clorofórmio, já que se assume que a fumigação apresenta pouca influência nas propriedades físico-químicas do solo em comparação com o processo de autoclavagem. Após 30 dias de pré-

incubação, a diversidade microbiana do solo, baseado na aparência das colônias, nos solos fumigados parecia ser reduzida, se comparado com a diversidade apresentada pelo solo não fumigado, como relatado anteriormente (22), embora o número de microrganismos tenha maior no solo fumigado.

Nenhum sintoma de murcha foi observado nas plantas de tomate cultivadas em solo Mutsumi não fumigado durante 50 dias de cultivo após o transplante. No solo fumigado com clorofórmio, as plantas começaram a murchar 6 dias após serem transplantadas, e praticamente todas as plantas sucumbiram por volta do 62º dia. Antes de ocorrer a murcha, não havia diferença aparente de crescimento das plantas entre as duas amostras de solo. Para se comparar o quanto os microrganismos nativos dos solos Mutsumi e Yamadai foram capazes de suprimir a murcha bacteriana, solo Mutsumi autoclavado foi misturado tanto ao solo Mutsumi quanto ao solo Yamadai intactos (razão 9:1 baseado no peso seco) e, posteriormente, inoculados como patógeno. Na mistura contendo solo Mutsumi intacto e autoclavado, 10% das plantas apresentaram murcha entre os 41 e os 54 dias após o transplante. Na mistura de solo Mutsumi autoclavado com solo Yamadai intacto, as plantas começaram a murchar 22 dias após o transplante e 66% das plantas apresentaram murcha por volta do dia 54.

A suspensão viscosa característica do patógeno foi encontrada em todos os caules das plantas que apresentaram murcha, testadas para se confirmar o agente causal dos sintomas. As colônias que cresceram sobre o meio seletivo de Hara e Ono foram identificadas como *R. solanacearum* patogênico, indicando que as plântulas foram infectadas pelo patógeno.

Atividade da poligalacturonase e taxa de crescimento das comunidades microbianas na rizosfera de tomate. Os microrganismos rizosféricos do solo Mutsumi mostraram uma maior atividade da poligalacturonase tanto no pH4,0 quanto no pH6,0 em comparação aos microrganismos do solo Yamadai. O número de bactérias após 12 h de incubação foi, também, maior nas amostras de solo Mutsumi em relação às amostras do solo Yamadai. Esses resultados sugerem que a população rizosférica nas amostras de solo Mutsumi apresentavam uma maior habilidade em assimilar pectina em relação ao solo Yamadai.

Considerações sobre o trabalho

Esse artigo foi sintetizado com o objetivo de facilitar a comunicação aos profissionais do setor agrícola. Aos autores do artigo, o Paces expressa os votos sinceros de gratidão pela contribuição a ciência, e esperamos que desse trabalho gere contribuições práticas para um manejo agrícola mais sustentável.