

EFEITO “in vitro” DE *Bacillus* spp. EM OVOS E JUVENIS DE *Meloidogyne graminicola*

Evangelho, D. B.; Camargo, D. P.; Fréo, R. B.³; Saccol, V. G.⁴; Azevedo, T. L.⁵; Silva, J. C. P.⁶; Santos, J. R. P.⁷

Palavras-chave: Arroz irrigado, nematoide-das-galhas, controle biológico

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil o nono maior produtor mundial. Diversas causas, incluindo as nematoses, têm contribuído para a redução da produtividade da cultura. Altas infestações de nematoides do gênero *Meloidogyne* podem causar perdas consideráveis na produtividade do arroz, pois afetam a absorção de água e nutrientes. As perdas de produtividade ocasionadas por *M. graminicola* estão entre 20 e 90%, relatadas ao redor do mundo (BRIDGE & PAGE, 1982; RAO et al., 1985; ARAYARUNG-SARIT, 1988; NETSCHER & ERLAN, 1993; PROT & MATIAS, 1995).

As medidas de controle ainda são restritas, não havendo cultivares resistentes conhecidas até o momento, da mesma forma que há escassez de produtos registrados para o patógeno na cultura do arroz irrigado. Os produtos biológicos, principalmente a base de bactérias dos gêneros *Pasteuria*, *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais utilizadas pelo nível de segurança ao consumidor, produtor e meio ambiente (SILVA, 2009). Os principais metabólitos secretados pelas espécies de *Bacillus* são os peptídeos e lipopeptídeos não sintetizados ribossomicamente, compostos policetídeos, bacteriocinas e sideróforos, sendo que o grupo dos lipopeptídeos afetam células alvo no nível da membrana (FIRA et. al, 2018). O emprego de agentes biológicos no controle de nematoides, segundo Maciel e Ferraz (1996), pode acontecer pela interrupção do ciclo ou da capacidade reprodutiva. O nematoide pode também não reconhecer os estímulos quimiotrópicos e continuar movimentando-se no solo até a morte (FREITAS, 2001; ARAÚJO et al., 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

O inoculo utilizado foi extraído de acordo com Boneti & Ferraz (1981), de culturas puras mantidas em plantas de arroz, cultivar Guri INTA CL. Ambos os ensaios, para efeito ovicida e nematicida, seguiram o modelo de delineamento inteiramente casualizado, composto de 8 tratamentos, com 4 repetições. O ensaio foi realizado em condições controladas de laboratório, em câmara de crescimento (B.O.D.), ajustada a 28°C, no escuro, em microtubos do tipo Eppendorf com a capacidade de 2 mL, devidamente identificados, os quais receberam os tratamentos, tendo sua dose calculada em função do volume de 2 mL, considerado como igual ao peso de 2 mg de sementes de arroz, além de uma testemunha (água destilada estéril) e um controle (álcool 70%).

Para avaliação do efeito ovicida, a suspensão contendo os ovos, em diferentes fases, foi quantificada em câmara de Peters e ajustada para 1000 ovos/ml. A suspensão recebeu os tratamentos e permaneceu em B.O.D. por 72 horas. Em seguida, os microtubos foram abertos e os ovos e J2 eclodidos foram colocados em água destilada estéril em uma câmara contendo uma peneira de 500 mesh. A cada 24 horas após a transferência dos ovos e J2, a água foi trocada e o número de J2 eclodidos foi estimado por 10 dias.

Na avaliação nematicida, a obtenção de J2 seguiu o protocolo de Cliff & Hirschmann (1985), e a solução foi calibrada para 100 J2/ml. A solução recebeu suspensão aquosa ou a dose utilizada do nematicida até completar o volume de 2mL, foi acondicionada em microtubos do tipo Eppendorf e mantida em B.O.D. por 24 horas, no escuro, e em seguida avaliados quanto a mortalidade e mobilidade após exposição à solução de NaOH, segundo Chen & Dickson (2000). Foram considerados mortos aqueles juvenis que, após 30 segundos de contato com a substância permaneceram estáticos, enquanto que aqueles que tiveram a forma do

corpo alterada foram considerados vivos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento “in vitro” realizado com ovos de *M. graminicola*, apenas os tratamentos compostos por *B. licheniformis* + *B. subtilis* e Abamectina diferiram estatisticamente da testemunha (água destilada estéril). Os demais nematicidas não apresentaram diferença significativa entre si e nem quando comparado com a testemunha. (Tabela 1), embora apresentem redução do percentual de eclosão.

Tabela 1 - Efeito na eclosão dos ovos de *Meloidogyne graminicola*

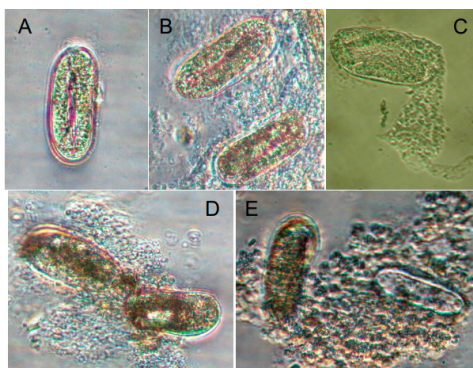
Tratamentos	Dose (p.a.)	Eclosão (%)
Água destilada estéril	1ml água dest.	13,72a*
<i>B. amyloliquefaciens</i> BV03	8 µl	11,95ab
<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI 600	1,6 µl	10,92ab
<i>B. amyloliquefaciens</i> PTA 4838	0,4 µl	10,80ab
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6 µl	10,10ab
<i>B. licheniformis</i> FMC01 + <i>B. subtilis</i> FMCH002	0,4 µg	9,40b
Abamectina	2,5 µl	2,87c
Álcool 70%	1 ml	0,00c

DMS: 4,26280968458549 NMS: 0,05 CV (%): 20.86

*Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si pelo Teste Tukey (P<0,05).

Embora a diferença entre os nematicidas biológicos seja estatisticamente irrelevante, é visível o grau de decomposição e a formação de colônias de bactérias (Figura 1), sugerindo que os agentes biológicos podem ter a capacidade de colonizar, alterar a permeabilidade da membrana ou romper as camadas envoltórias dos ovos de *M. graminicola*. De reprodução partenogênica meiótica facultativa, cada fêmea de *M. graminicola* pode depositar de 400 a 600 ovos, que são envoltos por uma massa gelatinosa. O tamanho dos ovos varia de 50 a 100 µm de comprimento, por 20 a 50 µm de largura, e sua casca apresenta três camadas. A camada externa é mais fina, a intermediária é composta basicamente por quitina e a camada mais interna por lipídeos. Todas as camadas envoltórias do ovo contêm proteínas. O corpo do nematoide, no entanto, tem a camada mais externa (cutícula) de composição predominantemente proteica (FERRAZ & BROWN, 2016). Considerando a constituição das camadas envoltórias dos ovos, um agente biológico com capacidade de secretar lipopeptídeos pode ter a capacidade de degradação da parede celular.

Figura 1. Efeitos do contato direto de ovos de *Meloidogyne graminicola* com nematicidas químicos e biológicos após 10 dias. A: Ovos em água destilada estéril; B: Ovos após *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600; C: Ovos após *Bacillus amyloliquefaciens* PTA-4838; D: Ovos após Abamectina; E: Ovos após *B. licheniformis* FMC 001+ *B. subtilis* FMCH 002



Fonte: arquivo dos autores

Em relação ao efeito dos nematicidas sobre a mortalidade dos juvenis de segundo estágio de *M. graminicola*, os produtos à base de *B. amyloliquefaciens* MBI600 e CCT7600 apresentaram índice de mortalidade semelhante ao químico (Abamectina) e ao controle (Etanol 70%). Os isolados de *B. amyloliquefaciens* PTA4838 e BV03 apresentaram uma taxa de mortalidade intermediária, estatisticamente diferente entre si (79,19% e 62,91%, respectivamente) (Tabela 2).

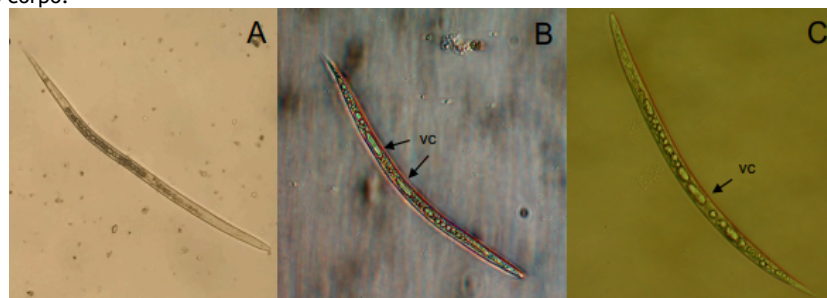
Tabela 2: Efeito na mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne graminicola*

Tratamentos	Dose (p.a.)	Mortalidade (%)
Álcool 70%	1 ml	100a*
<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600	1,6 µl	95,98a
Abamectina	2,5 µg	95,39a
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCT 7600	6 µl	92,08a
<i>B. amyloliquefaciens</i> PTA-4838	0,4 µl	79,19b
<i>B. amyloliquefaciens</i> BV03	8 µl	62,91c
Água destilada estéril	1 ml	15,83d
DMS: 12,8089861872441 NMS: 0,05		CV(%): 7,0

*Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si pelo Teste Tukey (P<0,05).

Os nematicidas biológicos conseguiram afetar o nematoide a nível intracelular, ao ponto de serem observados vacúolos em seu interior, sugestivos de grande gasto energético. (Figura 2).

Figura 2 - Efeito do contato de alguns produtos com os juvenis de *M. graminicola*. A: juvenis não tratados; B: juvenis tratados com *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600; C: juvenis tratados com *Bacillus amyloliquefaciens* PTA-4838. Na imagem estão destacados os vacúolos no interior do corpo.



Fonte: arquivo dos autores

CONCLUSÃO

Com base nos aspectos observados, nos experimentos “in vitro” o melhor desempenho de controle sobre os ovos de *M. graminicola* dentre os produtos biológicos avaliados foi *B. licheniformis* + *B. subtilis*. O efeito das diferentes espécies de *Bacillus* é predominantemente nematicida, sendo que *B. amyloliquefaciens* MBI600 e *B. amyloliquefaciens* CCT 7600 tiveram efeito nematicida equivalente ao nematicida químico Abamectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, F.F. et al. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural*, v. 32, n. 2, 2002.

Arayarung-sarit, L. Yield ability of rice varieties in field infested with root-knot nematode. *Rice*

Abstracts, 11, 294. 1988.

Bridge, J. & Page, S.L.J. The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. indica). *Revue de Nématologie*, 5, 225-232. 1982.

Rao, Y.S. Research on rice nematodes. In: Padmanabhan, S.Y. Rice in India, ICAR publication, India, p. 591-615. 1985.

Ferraz, L.C.C.B.; Brown, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. L.C.C.B. Ferraz e D.J.F. Brown (Orgs.). Manaus, 2016.

FIRA, D. et al. Controle biológico de fitopatógenos por espécies de *Bacillus*. *Journal of biotechnology*, v. 285, p. 44-55, 2018.

Freitas, L.G. Rizobactérias versus nematoides. Lavras, 2001.

Netscher, C. & Erlan. Root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, parasitic rice in Indonesia. *Afro-Asian Journal of Nematology*, 3, 90-95.1993.

Prot, J.C. & Matias, D.M. Effects of water regime on the distribution of *Meloidogyne graminicola* and other root-parasitic nematodes in rice field toposquence and pathogenicity of *M. graminicola* on rice cultivar UPL R15. *Nematologica*, 41, 219-228. 1995.

Silva, J.C. da S. et al. Compostos orgânicos voláteis no controle de fitonematoides. Lavras, 2009.