

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA E CONTROLE *IN VITRO*
DO NEMATÓIDE *Radopholus similis* POR ACTINOBACTÉRIAS**

JACQUELINE LEITE DIAS ESTEVAM

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2011

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA E CONTROLE *IN VITRO*
DO NEMATÓIDE *Radopholus similis* POR ACTINOBACTÉRIAS**

JACQUELINE LEITE DIAS ESTEVAM

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 1999.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Prof(a). Dr(a) Ana Cristina Fermino Soares

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

E79 Estevam, Jacqueline Leite Dias

Promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e controle *in vitro* do nematóide *Radopholus similis* por actinobactérias / Jacqueline Leite Dias Estevam. _ Cruz das Almas - Ba, 2011.

88 f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

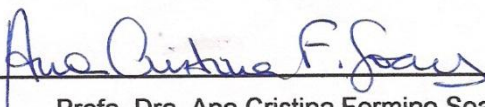
1. Banana – Nematóides. 2. Banana – Controle biológico.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

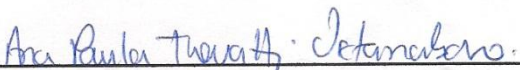
Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

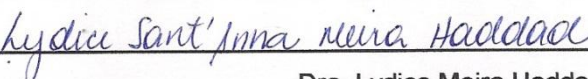
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Jacqueline Leite Dias Estevam



Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientadora)



Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Universidade Estadual de Santa Cruz
(Convidada)



Dra. Lydice Meira Haddad
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Convidada)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia
Agrícola em _____ conferindo o grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola em _____

Ao meu esposo Luciano, grande amor da minha vida, o qual admiro muito. À minha Nandinha, filha tão desejada. À minha mãe, Yêda Leite, que além do seu amor por mim, ensinou-me o valor da honestidade e do trabalho. À minha avó Odete, por toda força durante esse tempo, mesmo não estando mais em nosso meio. Aos meus familiares que sempre estiveram ao meu lado,

OFEREÇO

**À minha amada filha Fernanda Leite D. Estevam, meu amor Luciano Dantas e
minha mãe Yêda Leite Dias,**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força que dele obtive para seguir em frente neste caminho e vencer minhas limitações;

A minha amada mãe, a qual sempre esteve ao meu lado. Sua visão otimista com relação às coisas, muitas vezes me confortou e me deu forças para finalizar cada etapa deste trabalho;

A meu amado esposo Luciano Dantas Estevam, pelo apoio, companheirismo e pelas tantas vezes que me ajudou na condução dos experimentos. Sempre será um exemplo pra mim;

A meu presentinho do “céu” Fernanda, pelo amor incondicional todo este tempo;

Aos meus estimados e amados irmãos, Márcio, Gilberto, Leonardo, Thiago e minhas irmãs Georgia e Meire pela amizade e carinho.

A meu avô Jorge Leite por ter mim criado como filha, cercando-me de bons ensinamentos e amor.

A minha avó Risoleta Carneiro por toda a sua paciência e dedicação.

Aos meus sogros Manoel Dantas e Denide Francisca pelo apoio, carinho e por compreenderem a minha ausência durante este tempo.

As minhas amadas e lindas sobrinhas, Yasmim, Camila e Lara.

A minha cunhada Débora por tudo de bom que representa pra mim.

Aos meus cunhados, André, Márcio e Helison pela atenção e carinho.

A amiga Luciene Marques, pela amizade e pelo sorriso sempre.

As minhas grandes amigas Evani e Neide por estarem sempre perto de mim, mesmo quando estou ausente.

Ao meu amigo e colega de curso Djalma Moreira pelo incentivo.

Meu grande agradecimento a minha Orientadora, presente e amiga, Ana Cristina Fermino Soares, pela sua paciência e atenção. Grande é meu respeito e admiração por sua pessoa e seu profissionalismo.

Ao Prof. Jorge Teodoro de Sousa, pela confiança.

A minha amiga e estagiária Nelyane pela força e grande dedicação.

Ao professor Marlon, pelas sugestões que ajudaram na realização deste trabalho;

A Dr^a Carla Sousa, pela amizade, apoio e colaboração neste trabalho.

A técnica do laboratório e amiga Zozilene pela confiança, profissionalismo, amizade e por estar sempre pronta a ajudar. Grande amiga;

A técnica Nara pela amizade e colaboração nos trabalhos;

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao amigo e professor Clovis Peixoto, pelo incentivo;

Aos doutorandos Jefferson, Darcy e Augusto pela amizade, sugestões e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do laboratório (Nailson, Patrícia Oliveira, Márcia, Jucimara e Carol Yamamoto) pelo convívio e amizade;

As colegas do curso de Microbiologia Agrícola pela amizade;

Aos colegas que se tornaram amigos do peito Josilda e Erasto pela amizade e apoio na condução final dos trabalhos;

Aos colegas de Curso de Microbiologia Agrícola pelo carinho;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação pelo apoio;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pela oportunidade de crescer profissionalmente;

Em fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na condução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

Página

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1.0 INTRODUÇÃO.....	01
2.0 REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 1	
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA COM ACTINOBACTÉRIAS.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1.0 INTRODUÇÃO.....	24
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.0 CONCLUSÕES	50
5.0 REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO 2	
MULTIPLICAÇÃO DE <i>Radopholus similis</i> EM DISCOS DE CENOURA E BIOCONTROLE <i>IN VITRO</i> POR ACTINOBACTÉRIAS.....	58
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1.0 INTRODUÇÃO	61
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	64
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.0 CONCLUSÕES	73
5.0 REFERÊNCIAS.....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

RESUMO

Estevam, J. L. D. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA E CONTROLE *IN VITRO* DO NEMATÓIDE *Radopholus similis* POR ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias constituem um grupo de procariotos Gram-positivos, que ocorrem amplamente no solo, desempenhando relevante papel na promoção de crescimento de plantas e controle biológico. Este trabalho teve como objetivos: caracterizar isolados de actinobactérias quanto à produção de enzimas extracelulares; avaliar o potencial desses isolados na colonização de raízes e na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e avaliar o efeito de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias na mortalidade de *Radopholus similis*. Dos 21 isolados de actinobactérias testados, 80,9%, 42,85%, 38,04%, 90,47% apresentaram atividade celulolítica, quitinolítica, xilanolítica e de produção de ácido indolacético, respectivamente. Foram observados incrementos entre 42% e 75,8% para massa fresca da parte aérea e massa seca das raízes de mudas de bananeira, cultivadas no substrato Vivatto Slim® inoculado e incubado com as actinobactérias. Todos os isolados analisados colonizaram as raízes *in vitro*. Em ambos os experimentos, aos quarenta e cinco dias após inoculação e incubação e após a coleta das mudas, as densidades populacionais das actinobactérias no substrato foram superiores ao tratamento testemunha (substrato não esterilizado e não inoculado com actinobactérias) para todos os isolados testados. Nos testes *in vitro* dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias em meio de cultura líquido, observou-se até 87% de mortalidade de *Radopholus similis*.

Palavras-chave: Controle biológico, *Musa* sp. L.; *Streptomyces* spp.

ABSTRACT

Estevam, J. L .D. GROWTH PROMOTION OF MICROPROPAGATED BANANA PLANTS AND IN VITRO CONTROL OF *Radopholus similis* BY NEMATÓIDE POR ACTINOBACTERIA

Actinobacteria are a group of Gram-positive prokaryotes, which occur widely in soil, and play an important role in promoting plant growth and biological control of several pathogens. This study aimed to characterize isolates of actinobacteria for production of extracellular enzymes and indol acetic acid, to evaluate the potential of these isolates for root colonization and growth promotion of banana plantlets, and to evaluate the effect of secondary metabolites produced by actinobacteria in the immobility and mortality of *Radopholus similis*. Of the 21 isolates of actinobacteria tested, 80.9%, 42.9%, 38.0%, 90.4% were positive for production of cellulase, chitinase, xylanase, and indol acetic acid, respectively. An increase of 42.0% and 75.8% for shoot fresh weight and root dry weight was observed for banana plantlets grown in Vivatto Slim® plant growth substrate inoculated and incubated with actinobacteria. All isolates tested colonized roots of banana plantlets in vitro. For both experiments, forty-five days after inoculation and incubation, and after harvesting of banana plantlets, actinobacteria population densities were higher than the densities observed in the control treatment (non-sterilized substrate without actinobacteria inoculation), for all isolates of actinobacteria. In vitro tests of the secondary metabolites produced by actinobacteria in liquid culture medium showed up to 87.0% mortality rates of *Radopholus similis*.

Keywords: Biological control, *Musa* sp. L.; *Streptomyces* spp.

1.0 INTRODUÇÃO

A cultura da Bananeira

O centro de origem da bananeira é a região tropical que vai desde a Índia até Nova Guiné, incluindo a Malásia e Indonésia. Nesta região, alguns diplóides, possivelmente híbridos, adquiriram a capacidade de reproduzir mais polpa e se tornaram progressivamente sem sementes. A intervenção humana teve um papel fundamental na geração de bananas comestíveis, sendo que as bananeiras sem sementes só poderiam ter chegado a outras partes do mundo através do transplante de mudas pelo homem. Dessa forma, a história das variedades de banana está intimamente ligada a das populações humanas (DE LANGHE, 1996).

As bananeiras são monocotiledôneas, pertencentes ao gênero *Musa* L., família Musaceae L., sendo esta uma das seis famílias da ordem Zingiberales Grisebach. As espécies de importância econômica, *M. acuminata* e *M. balbisiana* apresentam número básico de cromossomo igual a 11. Atualmente, a maioria das variedades é híbrida destas duas espécies (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955).

As raízes da bananeira são fasciculadas ou em cabeleira e bastantes superficiais. O caule é subterrâneo, denominado de rizoma, onde estão localizadas a gema apical e as gemas laterais que dão origem aos perfilhos. O pseudocaule, denominado de tronco, é formado pelo conjunto das bainhas das folhas sobrepostas a partir do rizoma até a roseta, onde as folhas se abrem. As folhas se compõem de pecíolo e limbo foliar com as nervuras (SIMMONDS & SHEPHERD, 1955).

Quando ocorre a diferenciação floral da gema apical, forma-se no rizoma o “palmito”, que cresce no interior do pseudocaule emergindo na roseta. No momento da diferenciação floral já são estabelecidos os números de pencas e de dedos por penca. A partir do momento que o palmito atinge a roseta e se exterioriza, passa a ser denominado “engajo”, possuindo flores masculinas e femininas a ele aderidas e protegidas por brácteas (ALVES, 1999).

O cacho é um rácimo, constituído pelo engajo e também por ráquis, pencas e botões florais. Os frutos são de desenvolvimento partenocárpico, sendo

que algumas variedades apresentam algumas sementes viáveis, utilizadas em programas de melhoramento genético (ALVES, 1999).

As primeiras bananas cultivadas foram diplóides: a maioria das bananeiras produtoras de frutos comestíveis originou-se a partir da hibridação intra e interespecífica das espécies selvagens. Formas triplóides passaram a ocorrer como resultado de hibridações entre diploides parcialmente estéreis com formas macho-férteis e, por serem mais produtivos, mais vigorosos e produzirem frutos maiores, foram selecionados em preferência aos diplóides, substituindo-os em muitos locais (SHARROCK, 1998). Grande parte das cultivares é triplóide, sendo que diploides e tetraplóides ocorrem com maior frequência. Os tetraplóides podem se originar também a partir de hidridização natural, porém eles são mais raros que os triplóides (SIMMONDS, 1995).

As variedades mais difundidas no Brasil são a Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB, utilizadas unicamente para o mercado interno e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usadas principalmente para exportação. Em menor escala, são plantadas 'ouro' (AA), 'Figo cinza' e 'figo Vermelho' (ABB), 'Caru Verde' e 'Caru Roxa' (AAA). As variedades Prata, Prata Anã e Pacovam são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com banana no Brasil (BORGES et al., 2004).

Entretanto, todas apresentam pelo menos uma característica indesejável, como altura de planta inadequada ou suscetibilidade a alguma doença (SILVA et al., 1999). Trabalhos que envolvam avaliações de cultivares nas diferentes regiões são importantes e oferecem aos produtores opções de cultivo, além de colaborar com o desenvolvimento regional da cultura (SILVA et al., 2006).

As bananeiras 'Pacovan', 'Prata', 'Terra' e 'Mysore' apresentam porte alto. A banana 'Maçã' é altamente suscetível ao mal-do-Panamá, as variedades Nanica, Nanicão, Grande Naine, Terra e D'Angola apresentam alta suscetibilidade aos nematóides e a Mysore está infectada com BSV. Todas essas variedades são suscetíveis à Sigatoka-negra. Excetuando a 'Maçã', 'Mysore', 'Terra' e 'D'angola', as variedades citadas são também altamente suscetíveis à Sigatoka-amarela (BORGES et al, 2004).

A bananeira (*Musa spp.*) é uma planta de grande importância sócio-econômica no mundo, com o mais alto índice de consumo per capita entre as

frutas tropicais, e um comércio tradicional consolidado e bem distribuído (BRASIL, 2008). O consumo de banana mundial per capita cresceu 72%, nos últimos 40 anos (FAO, 2004).

A produção mundial de banana gira, em torno de 71,5 milhões de toneladas (FAO, 2007), sendo a Índia, Brasil, China e Equador os principais produtores, os quais, no conjunto, respondem por quase 50% do total produzido. No Brasil, a banana é a segunda fruta mais cultivada, estando presente em todos os estados, desde a faixa litorânea até os planaltos centrais (FAO, 2007). Entretanto, devido a fatores climáticos, a exploração da banana está concentrada no Estado de São Paulo, seguido pela Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e o estado do Pará. Com relação à produtividade, o destaque nacional é o estado do Rio Grande do Norte com a expressiva marca de 31,4 toneladas/ha, sendo 135% maior que a média de 13,4t/ha do país (FAO 2007). Na sequência, aparecem Santa Catarina com produtividade superior à média brasileira em 64% e São Paulo, em 54,7% (FAO, 2007).

No Brasil, a bananeira representa uma planta de grande valor econômico e social, por gerar muitos empregos, além de ser uma importante fonte de alimento (COSTA, 2004). A safra da banana em cacho foi de 6,78 milhões de toneladas em 2009, sendo 3,1% menor que a de 2008. A área colhida foi de 479,6 mil hectares, com rendimento médio de 14.144 kg/ha. Os seis maiores estados produtores (SP, BA, SC, MG, PA e PE) responderam por 65,7% da produção. São Paulo, com aumento de 2,6%, totalizou 1,26 milhão de toneladas (18,5% do total) e voltou a ser o principal produtor nacional da fruta, superando a Bahia, cuja produção caiu 28,4% (1,02 milhão de toneladas, 15,0% da produção nacional (IBGE, 2009).

Apesar de ser um dos maiores produtores mundiais, o Brasil apresenta baixa produtividade média, quando comparado com outros países como Guatemala e Costa Rica (FAO, 2007). Vários aspectos são atribuídos à baixa produtividade da bananicultura brasileira, como por exemplo, fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários. O baixo rendimento constatado nas regiões produtoras de banana evidencia a necessidade de ajustes tecnológicos e no manejo da cultura nas

diversas áreas do conhecimento que sejam capazes de superar as limitações para exportação (ALVES, 1999).

Aspectos fitossanitários da bananicultura

A qualidade da bananicultura brasileira, salvo algumas áreas de produção, caracteriza-se pelo nível técnico dos cultivos. Em geral, bananais mal cuidados são comumente afetados, com grande intensidade, por problemas fitossanitários. Estes, por sua vez, contribuem decisivamente para a baixa produtividade e qualidade dos frutos que são produzidos em nosso país (CORDEIRO, 1997).

Dentre os principais problemas fitossanitários, destacam-se a susceptibilidade as Sigatokas negra e amarela, ao mal-do-Panamá, ao Moko da bananeira e a nematóides, destacando-se o nematoide cavernícola *Radopholus similis* (COSTA, 2000). Estes problemas fitossanitários têm gerado grandes prejuízos para o produtor, chegando a inviabilizar o cultivo da bananeira em algumas propriedades (COSTA, 2000).

Nematóides na cultura da bananeira

Os nematóides são um grupo de organismos multicelulares diferenciados dos invertebrados que, em geral, se classificam como uma classe do reino animal e que possuem adaptação a uma grande variedade de ecossistemas (CHRISTIE, 1986). Foram descritas aproximadamente 146 espécies de nematóides parasitas associados às Musas, distribuídas em 43 gêneros (ARAYA & CENTENO, 1995).

Os fitonematóides estão entre os principais problemas fitossanitários da bananicultura brasileira. As perdas na produção podem chegar a 100%, quando o seu controle não é efetuado corretamente. Danos nas raízes e nos rizomas, causados pela invasão de nematoides, seguidos da penetração por fungos e bactérias, são os mais sérios problemas nas variedades do subgrupo Cavendish depois da Sigatoka-negra (COSTA, 2000). Estes nematóides comprometem a absorção e transporte de água e nutrientes pelo sistema radicular, provocando o tombamento de plantas e predisposição ao ataque de outros microrganismos (DIAS & RIBEIRO JUNIOR, 2001).

Dentre os nematóides, *Radopholus similis* e *Meloidogyne spp.* destacam-se pelos danos causados à cultura e pela ampla distribuição nas principais regiões produtoras de banana no mundo. No Brasil, há relatos de diversas espécies que causam danos na bananeira, entretanto, apenas *R. similis* é tida como de maior importância econômica para a bananicultura no Brasil e no mundo. No território brasileiro, o *R. similis* tem causado prejuízos nas regiões do país onde ocorreu a expansão da cultura, no entanto, as espécies de nematóides predominantes diferem nas diferentes regiões produtoras de banana (COSTA, 2000).

Em levantamento realizado no Norte de Minas Gerais, DIAS & RIBEIRO JUNIOR, (2001) constataram as espécies *Radopholus similis* (COBB) Thorne, *Helicotylenchus multicinctus* (COBB) Golden, *Pratylenchus coffeae* (ZIMMERMAN) FILIPJEV e STEKHOVEN, *Rotylenchulus reniformis* LINFORD e OLIVEIRA e *Meloidogyne spp.* GOELDI, as quais são citadas na literatura como as principais espécies patogênicas à bananeira.

Biologia e danos causados pelo nematóide cavernícola da bananeira *Radopholus similis*

O nematóide *R. similis* é vulgarmente chamado de cavernícola, devido ao sintoma que ele causa no córtex das raízes e rizoma de bananeiras em virtude da ação do endoparasitismo migratório. Apresenta-se vermiforme tanto no estágio juvenil como no adulto, ciclo de vida tem duração de três a quatro semanas. No tecido infectado, as fêmeas ovipositam de 4 a 5 vezes por dia durante duas semanas. Os ovos eclodem depois de 8 a 10 dias e os estádios juvenis requerem entre 10 e 13 dias para completarem seu desenvolvimento, depois de três ecdises subsequentes, originando os adultos machos e fêmeas (MARIN et al., 2002). As fêmeas juvenis e adultas possuem formas móveis que podem deixar a raiz em condições adversas. Os nematóides nos estádios migratórios no solo podem facilmente invadir raízes sadias. É marcante o dimorfismo sexual entre essas espécies. O macho apresenta o aparelho digestivo degenerado, estilete atrofiado e não é considerado parasita. As fêmeas são providas de forte estilete e esôfago

completo. A reprodução se dá por anfimixia, podendo ocorrer, excepcionalmente, partenogênese (COSTA, 2000).

Os danos causados nas raízes e no rizoma são atribuídos às formas juvenis e às fêmeas de *R. similis*. A penetração dos nematóides ocorre preferencialmente pelo ápice radicular, entretanto, *R. similis* pode invadir qualquer porção da raiz. Ao migrar inter e intracelularmente, se alimenta do citoplasma de células do parênquima cortical, destruindo paredes celulares, extravasando o conteúdo celular e causando cavidades e túneis que necrosam e podem estender-se por toda a região parenquimática. Este problema é agravado pelo movimento contínuo do nematóide no tecido, cuja consequência é a formação de extensas áreas necróticas de coloração avermelhada, infectadas por todos os estádios do nematóide. Quando ocorre alta infestação, *R. similis* provoca rachaduras ao longo das raízes, facilitando a penetração de patógenos secundários, sendo os mais comuns os fungos *Cylindrocarpon musae*, *Acremonium stromaticum* e o agente causal do mal-do-Panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (SARAH et al., 1996). A presença desses fungos nas lesões provavelmente aumenta a deterioração da raiz e contribui para a queda das plantas. O nematóide migra para os tecidos saudáveis antes que os tecidos atacados sofram necrose ou simplesmente migram para o solo em busca de raízes para infectar e alimentar-se (FERNANDEZ, 1994).

Em consequência do ataque de nematóides, quando a infestação é severa, ocorre a formação de raízes secundárias, resultando num sistema radicular muito raquítico que não suporta o peso do cacho ocasionando o tombamento das plantas. Além disso, o sistema radicular apodrece e as plantas não absorvem água e nutrientes do solo, tendo como consequência, tempo de vida reduzido, crescimento prejudicado, plantas amareladas, com menor produção e frutos pequenos (FERNANDEZ, 1994).

Em geral, os danos de fitonematóides em cultivos de bananeira são diretamente proporcionais ao aumento de suas populações, ocorrendo redução do tamanho e peso, atraso na maturação dos cachos, pouco perfilhamento e morte das plantas. Outro fator endógeno que afeta a dinâmica populacional é a presença de variações patogênicas dentro das espécies (COSTA et al., 1998).

A contaminação de áreas agrícolas por nematóides, bem como a sua disseminação para novas áreas, ocorre principalmente por água de irrigação ou de chuva, por solo aderido a máquinas agrícolas e por material propagativo infectado como mudas e sementes (AGRIOS, 1997).

Para o manejo dos nematoides, frequentemente, se recorre ao controle químico que tem seu uso cada vez mais limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento, ou baixa eficácia de controle depois de repetidas aplicações (DONG & ZHANG, 2006). Dentre as alternativas de controle destes parasitas, destaca-se o uso de mudas micropropagadas e o controle biológico. Diversos microrganismos, entre eles as bactérias têm tido destaque como agentes com potencial para o biocontrole, por produzirem metabólitos secundários com ação nematicida.

A busca por microrganismos benéficos, agentes de controle biológico, como alternativa para aumentar a produtividade de plantas e melhorar seu estado fitossanitário, vem crescendo na pesquisa agrícola nas últimas décadas.

Controle Biológico

O controle biológico é definido por Cook e Baker (1993) como a redução da intensidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença realizadas por meio de um ou mais organismos que não o homem. O controle biológico de doenças de plantas pode também ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, por meio da ação de um ou mais organismos. Nesta definição, segundo JUNQUEIRA & GASPAROTTO (1991), as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução do patógeno.

Dentre os habitantes da rizosfera antagonistas a nematóides, os fungos têm sido mais os estudados, seguidos das bactérias (CRAWFORD et al., 1993). As actinobactérias (MILLER et al., 1990) ocorrem em solos pobres, onde a escassez de

nutrientes diminui a pressão de competidores (ALEXANDER, 1977). Alguns isolados têm comprovada eficácia na diminuição de doenças do sistema radicular como aquelas causadas por *Sclerotinia minor*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Halstonia solanacearum* e *Agrobacterium tumefaciens* (WOOD, 1951; MURRAY, 1987; EL-ABYAD & EL-BATANOINY, 1993; TARABILY et al., 2000). Isolados de actinomicetos têm sido eficazes na redução de galhas causadas por nematóides e na reprodução de nematóides (DICKLOW et al., 1993; ESNARD et al., 1998; JONATHAN et al., 2000).

Na rizosfera os actinomicetos têm seu crescimento estimulado por exsudatos (ROVIRA, 1965), os quais variam entre as plantas (GESHEVA, 2002).

O controle biológico tem se apresentado eficiente e viável para o manejo de varias culturas por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA, 2005). Este visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função do controle de patógenos dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL, 1991). Assim sendo, este método de controle inclui práticas culturais que promovem um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos; o melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; a introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos benéficos (CARDOSO, 1978).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico é de fundamental importância para aumentar as vantagens competitivas no ambiente. Os principais mecanismos das interações antagônicas entre microrganismos incluem a competição, a antibiose e o micoparasitismo, além da indução de resistência do hospedeiro (MOORE-LANDECKER, 1996; TRONSMO & HJELJORD, 1998).

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são capazes de induzir resistência sistêmica em plantas. A ISR (*Induced Systemic Resistance*) pode ser definida como um processo de defesa ativa da planta contra uma variedade de patógenos. A planta utiliza múltiplos mecanismos induzidos sistemicamente por rizobactérias (LUZ, 1996). Alguns dos mecanismos propostos para indução de resistência sistêmica em plantas por RPCPs incluem vários

processos fisiológicos, tais como: aumento da produção das proteínas solúveis em ácido (ZDOR & ANDERSON, 1992), acúmulo de fitoalexinas (VAN PEER et al., 1991), lignificação (HOFFLAND & BIK, 1993), produção de ácido salicílico em baixa concentração de ferro (LEEMAN et al., 1995).

Outros importantes mecanismos de supressão de patógenos por rizobactérias são a produção de enzimas líticas que atuam na lise de células fúngicas, como quitinases e β -1,3-glucanases, que degradam a quitina e o glucano presentes nas paredes das células fúngicas e promovem a degradação de toxinas produzidas pelos patógenos (BERG et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Dentre os agentes de controle biológico e também de promoção de crescimento de plantas, os actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* têm um papel importante na rizosfera de plantas, por influenciarem o seu crescimento, colonizando as raízes e agindo contra fungos e bactérias fitopatogênicas, devido à produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (RAUPACH & KLOEPFER, 1998; COMPANT et al., 2005.).

Promoção de crescimento de plantas

Praticamente todas as espécies de plantas terrestres estudadas estabelecem relações complexas com uma grande variedade de microrganismos (BRUNDRETT, 2009). Diversos microrganismos são conhecidos por promover o crescimento das plantas e aumentar a tolerância dos vegetais aos estresses bióticos e abióticos. Microrganismos promotores de crescimento de plantas colonizam a rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes (LUGTENBERG & KAMILAVA, 2009).

Diversas bactérias têm sido estudadas em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, feijão (SILVEIRA et al., 1995), milho (ARAÚJO et al., 2000), citrus (ARAÚJO et al., 2001; AMORIM & MELO, 2002), batata (REITER et al., 2002), trigo e sorgo (ZINNIEL et al., 2002), cacauero (SILVA, 2007); tomateiro (LIMA 2003; SOUSA, 2006; SOARES, 2010), bananeira (PAIXÃO, 2008), dentre outras.

Um dos objetivos da pesquisa agrícola nas últimas décadas vem sendo a busca por microrganismos benéficos ao crescimento vegetal e agentes de

controle biológico, visando o aumento da produtividade agrícola e o desenvolvimento de sistemas de produção agrícola mais sustentáveis. De fato, uma das estratégias de manejo que não causam maiores danos ao meio ambiente é o uso de rizobactérias como agentes de biocontrole e promoção de crescimento de plantas (BENIZRI et al., 2001).

Actinobactérias

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, predominantemente filamentosas, a maioria aeróbia e crescem preferencialmente em solos com pH neutro à alcalino, embora muitas cresçam em solos ácidos (GARRITY et al., 2003).

O ciclo de vida das actinobactérias inicia-se com a germinação do esporo, dando origem a um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas de nutrientes como polissacarídeos (amido, pectina, quitina, celulose), proteínas (queratina, elastina), lipídeos e compostos aromáticos, pela ação de enzimas extracelulares. A partir deste micélio vegetativo (hifas primárias), desenvolve-se o micélio aéreo (hifas aéreas) no centro da colônia. As hifas podem apresentar-se multinucleadas ou em compartimentos mononucleados, que darão origem as cadeias de esporos. Nesta fase, ativa-se o metabolismo secundário, com a produção, principalmente, de antibióticos e pigmentos (ARAUJO, 1998; PADILHA, 1998).

A ocorrência de actinobactérias nos diferentes ecossistemas decorre da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão. Esta diversidade metabólica mostra a grande variabilidade destes microorganismos em colonizar ambientes salinos, ácidos, com elevada temperatura, indicando a grande capacidade de se adaptarem a ambientes extremos (ARAUJO, 1998).

Uma característica marcante dos actinobactérias é a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas comumente encontradas nos solos como caseína, amido, quitina, húmus, celulose, lignocelulose, além da síntese e excreção de metabólitos secundários como antibióticos e o terpenóide geosmin (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Dentre as várias rizobactérias utilizados no biocontrole, as actinobactérias vem sendo testadas com resultados promissores (ROMEIRO, 2007). Elas podem ser encontradas em nichos ecológicos, tais como a rizosfera e o rizopiano de plantas, onde sobrevivem, multiplicam-se e protegem-se do antagonismo da microbiota circunvizinha (BENIZRI et al., 2001; SILVA et al., 2003).

O uso destes microrganismos no controle biológico de patógenos data desde 1914 (Moura, 1996). Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico e promoção de crescimento (Melo, 1998; Moura et al., 1998; Thirup et al., 2001; Paixão et al., 2008; Soares et al., 2010).

Mudas micropropagadas

A micropropagação, mediante a cultura de ápices caulinares *in vitro*, tem sido adotada em muitos países para a produção de mudas de bananeira. No Brasil, esse método vem sendo utilizado de maneira crescente nos últimos anos, permitindo assim, um acesso mais rápido dos agricultores a mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais e dos novos híbridos desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético. A técnica geralmente envolve o desenvolvimento *in vitro* de brotos a partir de gemas (ápices caulinares ou florais), nos quais é induzida a formação de novas gemas, em condições controladas de cultivo (EMBRAPA, 2004)

As principais vantagens da micropropagação incluem a uniformização no desenvolvimento das mudas, o que permite a uniformização do plantio e sincronização da colheita, e a obtenção de plantas com características genéticas idênticas à matriz e saudáveis, evitando assim a disseminação de pragas e doenças (EMBRAPA, 2004)

Entretanto, a micropropagação também elimina a microbiota benéfica ao crescimento vegetativo (LAZAROVITS & NOWAK, 1997). As plântulas micropropagadas apresentam reduzida capacidade fotossintética, sistema radicular pouco desenvolvido, poucos pelos radiculares e baixo número de folhas (NOWAK, 1998; NOWAK et al., 1998). A reintrodução de isolados selecionados de microrganismos benéficos ao crescimento vegetal via tratamento de explantes,

pode promover o crescimento das futuras plântulas e protegê-las contra doenças (LAZAROVITS & NOWAK, 1997; SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002).

Considerando a demanda por métodos alternativos ao uso de insumos químicos para a produção de mudas de qualidade e o controle de nematóides na bananicultura, o presente trabalho teve como objetivo selecionar isolados de actinomicetos para a promoção de crescimento de mudas de bananeira e o controle do nematoide *Radopholus similis*.

No capítulo 1, apresenta-se o estudo sobre o potencial de actinobactérias na promoção de crescimento de mudas de bananeira micropropagadas. Para tal, 21 isolados de actinobactérias foram testados em estudos *in vitro* e em casa de vegetação.

O segundo capítulo apresenta o estudo sobre o potencial de actinobactérias no controle *in vitro* do nematoide *Radopholus similis*. Foram avaliados os mesmos 21 isolados utilizados nos testes de promoção de crescimento, citados no capítulo 1 deste trabalho.

2.0 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press: 1997. 635 p.
ALVES, E.J. (Org.). A Cultura da banana: aspectos técnicos, sócio-econômico e agroindustriais. 2. ed.; ver. Brasília: Embrapa SPI; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 1999.585p.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS, L. F. L.; VELOSO, M. E. C.; SOUZA, V. A. B.; SOUSA, V. F. Avaliação de Genótipos de Bananeira no Estado do Piauí. 1. Comportamento Vegetativo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2001, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002.

ARAYA, M.; CENTENO, M; CARRILLI, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencias de los nematodos parásitos del banano (*Musa AAA*). **Revista CORBANA** 20(43):3-6.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p 351-367, 1998.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUIAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.447-451, 2000.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.557-574, 2001.

BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E. M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium wilt*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p1-10, 2000

BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção, In: Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N. (Eds). Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas. Belém. Embrapa Amazônia Oriental, 2008 PP. 289-308.

BORGES, A. L, et al, O Cultivo da Bananeira, Embrapa Mandioca e Fruticultura-Cruz das Almas,. ISBN: 85-7158-010-3. p. 279,2004

BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v.320, p.37–77, 2009.

CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microorganismos. In: GALLI, F. (ed) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, SP, Ceres, v.1. 1978. 373 p.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinobactérias na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.232-238, 2005.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promotion bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4951-4959, 2005.

CORDEIRO. Z. J. M. Doenças. In: ALVES, E. J.(Ed). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômico e agroindustriais**. Brasília: Embrapa, cap. 13. P. 353-398. 1997.

CORDEIRO. Z. J. M. sistema de produção de banana para o estado do Pará.<http://sistemadeprodução.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/Banana/BananaPara/doenças.htm>. consultado em outubro de 2010.

CORDEIRO. Z. J. M. & MATOS, A. P. Doenças. In: CORDEIRO. Z. J. M. (ed.) **Banana Produção: aspectos técnicos**. Embrapa, Brasília. P.106.2000.

CORDEIRO, Z.J.M. et al. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). **Manual de fitopatologia**, v.2, p.99-117, 2005.

COSTA, D. da C. Nematoses em banana e abacaxi no Brasil: danos e manejo. XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Uberlândia, v.22, p. 50-58, 2000.

COSTA, D. da C. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

CRAWFORD, D. L. et. al. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. Oxford, v.59, n.11, p. 3899, 1993.

DE LANGHE, E. Banana and plantain: The earliest Fruit crops? In: Inibap annual report 1995. Inibap: Montpellier. P 6-8. 1996.

DIAS, M.S.C.; RIBEIRO JUNIOR, P.M. **Nematóides na bananicultura** In: Simpósio Norte Mineiro sobre a Cultura da Banana. Montes Claros: Ed. Unimontes, p. 168-179, 2001.

DONG, L.Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, p. 31-45, 2006.

DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; LUCCA FILHO, O. A.; LIMA, M. B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de híbridos e variedades de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.139-144, 2006.

FERNANDEZ, A. El banano em Ecuador; cultivo-plagas-enfermidades. Guayaquil, Ecuador, C&C. 1994. 303p.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, p.397, 2003.

GROENEWALD, S. et al. The application of high-throughput, AFLPs in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **Mycological Research**, v.110,p.297-305,2006.

HINZ, R. H. Moko e Sigatoka Negra. In: **Curso sobre doenças da bananeira**. Jataí - GO: DFA/GO, p. 9, 2000.

HOFFLAND, E.; BIK, L. *Pseudomonas* - induced resistance against *Fusarium* wilt
In: International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, International
Society of Plant Pathology, p.216 (abstr), 1993.

JUNQUEIRA, N.T. V; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos
causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W., (Ed.). **Controle
biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, CNPDA/EMBRAPA, p. 307- 331,
1991.

KIMATI, H & GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: GALLI, F. **Manual de
Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2.
Pg. 87-101, 1980.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and
establishment. **Hort Science**, v. 32, n. 2, p. 188-192, 1997.

LEEMAN, M.; VAN PELT, J. A.; HENDRICKX, M. J.; SCHEFFER, R. J.; BAKKER,
P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Bicontrol of fusarium wilt of radish in commercial
greenhouse trial by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374,
Phytopathology, v.85, p.1301-1305, 1995.

LIMA, J.L. **Seleção de actinobactérias para o controle biológico de *Ralstonia
solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82f.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia,
Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu
Rev Microbiol**. v.63, p.541–556, 2009.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção.
Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.4, p.1-49, 1996.

MARIN, D.H.; SUTTON, T.B.; BARKER, K.R. Diseminación del banano em
Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*
Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. N. 66. p. 62-75. 2002

MELO, I. S. de, Rizobactérias Promotoras de crescimento de plantas: descrição e
potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S de & AZEVEDO, J. L.
(Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p. 87-110, 1998.

MOURA, A. B. **Actinobactérias como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro.** 1996, 64f., Tese de (Doutorado em Fitopatologia),Viçosa. Universidade Federal de Viçosa,1996.

MOURA, R. J. M.; SILVA JÚNIOR, J. F.; SANTOS, V. F.; SILVA, S. O.; SÁ, V. A. L.; ANDRADE, O. J. L. Avaliação de Cultivares e Híbridos de Bananeira na Zona da Mata Norte de Pernambuco (1º Ciclo). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2001, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002.

MOURA, A. B. et al. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, v.33, n.12, p. 2065-2072,1998.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA.p 626, 2002.

NOWAK, J.; ASIEDU, S. K. BENSALIM, S.; RICHARDS, J.; STEWART, A.; SMITH, C.; STEVENS, D.; STURZ, A. V. From laboratory to applications: challenges and progress with “in vitro” dual cultures of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 52, p. 97-103, 1998.

NOWAK. J. Benefits of “in vitro” biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell. Dev. Biology (IVCDB)-Plant**, v. 34, p. 122-130, 1998.

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematóide cavernícula da bananeira *Radopholus similis*.** 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**, Juaguariúna, EMBRAPA –CNPMA,. p. 327-343, 1998

PEREIRA, M. C. T.; SALOMÃO, L. C. C.; SILVA, S. O.; CECON, P. R.; PUSCHMANN, R.; JESUS, O. N.; CERQUEIRA, R. C. Suscetibilidade à queda natural e caracterização dos frutos de diversos genótipos de bananeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.499-502, 2004.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p.653-656,

2006. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0648>>. Acesso em: 06 fev. 2009. doi: 10.1094/PHYTO-96-0648.

PLOETZ, R.C. & PEGG, K.G. Fusarium wilt. In Jones DR (ed) Diseases of banana, a abaca and enset. (CABI Publishing: Wallingford, UK). P. 143-159, 2000.

PLOETZ, R.C. THOMAS, J. E. & SLABAUGH, W.R. **Diseases of banana and plantain**. In Ploetz RC (ed) Diseases of tropical fruit crops. (CABI publishing: wallingford, UK). Pp. 73-134, 2003.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *Atrosptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v.88, p. 1158-1164, 1988.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa MG. Editora UFV. 2007, 269p.

SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotionrhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

SARAH, J.L.; PINOCHET, J.; STANTON, J.M. The burrowing of bananas, *Radopholus similis* Cobb. *Musa* Pest Fact Sheet No. 1; INIBAP Montpellier, France. 1996.

SEAGRO. Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Goiás. **Banana**: Municípios Maiores Produtores em 2000, 2001 e 2002. Disponível em: <http://www.agronegocio.goias.gov.br/docs/portal/bananae.pdf>.>. Acesso em: 05 de janeiro de 2011.

SHARROCK, S. Collecting the *Musa* gene pool in papua New Guinea. In: GUARINO. L: RAO. V. R.(eds). Collecting plant genetic diversity. Wallingford: C.A.B International. Cap 33: p. 647-658, 1998.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Biol Fertil Soils**, v. 36, p. 260–268, 2002.

SILVA, A.C.M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. 2007, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

SILVA, E. A.; BOLIANI, A.C.; CORRÊA, L. de S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria-MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.101-103, 2006.

SILVA, S. O.; ROCHA, S. A.; ALVES, E. J.; CREDICO, M. D.; PASSOS, A. R. Caracterização morfológica e avaliação de cultivares e híbridos de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, 2000.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; DANTAS, J. L. L. Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.85-105, 1999.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v.51, p.42-46, 2003.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C.; LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.205-211, 1995.

SIMMONDS, N.W. E SHEPHERD. K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *J. Linn Soc Bot*, v. 55, p. 302-312, 1955.

SIMMONDS, N. W. Bananas. In: SMARTT, J. & SIMMONDS, N. W.(Eds) *Evolution of crop plants*. Essex: Longman. P. 370-375, 1995.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa. Agropecuária. Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 447-453, out./dez. 2010.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; ALMEIDA, G. M. Actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas spp.* and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicide imazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1147 – 1153, 2001.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biology control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1991.

ZDOR, R.; ANDERSON, A. J Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of beans. **Bulletin-SROP**, v.14, n.8, p.187-190, 1992.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

CAPÍTULO 1

**Promoção de crescimento de mudas micropropagadas de
bananeira com Actinobactérias**

RESUMO

Estevam, J. L. D. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA COM ACTINOBACTÉRIAS.

As actinobactérias constituem um grupo de procariotos Gram-positivos, que desempenham um relevante papel no controle biológico e promoção de crescimento de plantas. Este trabalho teve como objetivos: caracterizar os isolados de actinobactérias quanto à produção de enzimas extracelulares (celulase, xilanase, quitinase e lipase) e de ácido indolacético; avaliar a densidade populacional desses isolados no substrato após incubação deste e plantio das mudas e avaliar o potencial das actinobactérias na colonização de raízes e promoção de crescimento de mudas de bananeira. Do total de 21 isolados de actinobactérias testadas, oito apresentaram atividade xilanolítica, 17 apresentaram atividade celulolítica, nove apresentaram atividade quitinolítica, 18 apresentaram atividade lipídica e 19 apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. Foram avaliados para promoção de crescimento de mudas de bananeira, nove e treze isolados de actinobactérias no primeiro e segundo experimentos, respectivamente, por meio da inoculação e incubação do substrato Vivatto Slim®, seguido de plantio de mudas micropropagadas de bananeira, variedades 'Maravilha' e 'Grande Naine'. A população das actinobactérias no substrato inoculado variou entre $1,70 \times 10^4$ e $2,68 \times 10^6$ UFC g^{-1} de substrato, após os 45 dias de incubação antes do plantio e de $1,80 \times 10^4$ a $2,82 \times 10^6$ UFC g^{-1} de substrato, após a coleta das plantas, no experimento 1, e de $1,70 \times 10^4$ a $2,20 \times 10^6$ UFC g^{-1} de substrato após 45 dias de incubação antes do plantio e de $1,70 \times 10^4$ a $2,90 \times 10^6$ UFC g^{-1} após a coleta das plantas, no experimento 2. A maioria dos isolados das actinobactérias apresentou a capacidade de colonização radicular *in vitro* das mudas, para ambas as variedades. O efeito benéfico no crescimento vegetal foi observado na altura, massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca da raiz de mudas de bananeira, promovido por alguns isolados de actinobactérias com variações entre as cultivares 'Maravilha' e 'Grande Naine', sendo, portanto, relacionado ao isolado bacteriano e da variedade de bananeira.

Palavras-chave: *Musa* sp L.; *Streptomyces* spp., plantas micropropagadas

ABSTRACT

Estevam, J. L. D. GROWTH PROMOTION OF MICROPROPAGATED BANANA PLANTLETS WITH ACTINOBACTERIA

Actinobacteria are a group of Gram-positive prokaryotes, which play an important role in biological control and growth promotion of plants. This study aimed to characterize the isolates of actinobacteria for production of extracellular enzymes (cellulase, xylanase, chitinase and lipase), and indole acetic acid, to determine the population density of these isolates in the plant growth substrate after incubation and after plant growth, and to evaluate the potential of actinobacteria for in vitro root colonization, and growth promotion of banana plantlets. Of the total 21 isolates of actinobacteria tested, eight showed xylanolytic activity, 17 showed cellulolytic activity, nine showed chitinolytic activity, 18 showed lipase activity, and 19 presented the ability to produce indol acetic acid. For plant growth promotion, nine and thirteen actinobacteria isolates were tested in the first and second experiment, respectively, with inoculation and incubation of plant growth substrate Vivatto Slim®, and growth of micro-propagated banana plantlets, variety 'Grande Naine' and 'Maravilha'. The population of actinobacteria in the inoculated substrate ranged from 1.7×10^4 to 2.68×10^6 CFU g⁻¹ substrate, after 45 days of incubation and 1.8×10^4 to 2.82×10^6 CFU g⁻¹ substrate, after plant harvesting in the first experiment, and 1.7×10^4 to 2.20×10^6 CFU g⁻¹ substrate after 45 days of incubation and 1.7×10^4 to 2.90×10^6 CFU g⁻¹ after plant harvesting in the second experiment. Most actinobacteria isolates presented capacity for in vitro root colonization of plantlets, for both varieties. Beneficial effects on plant growth were observed for plant height, fresh shoot and root weight and root dry weight of banana plants, as being promoted by some actinobacteria isolates, with variations between banana cultivars 'Maravilha and 'Grande Naine', being, therefore, related to the actinobacteria isolate and the banana cultivar.

Key-words *Musa* sp L.; *Streptomyces* spp. micropropagated plants

1.0 INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta de grande importância socioeconômica no mundo, com o maior índice de consumo per capita entre as frutas tropicais, e com comércio tradicional consolidado e bem distribuído (BRASIL, 2008).

No entanto, a cultura apresenta diversos problemas fitossanitários como a susceptibilidade às sigatokas amarelas e negra, ao mal-do-Panamá, ao Moko da bananeira e a nematóides, destacando-se o nematóide cavernícola *Radopholus similis* (COSTA, 2000). Estes problemas fitossanitários têm gerado grandes prejuízos para o produtor, chegando a inviabilizar o cultivo da bananeira em algumas propriedades (COSTA, 2000).

A utilização de insumos biológicos, a exemplo de microrganismos benéficos para agricultura, que atuam na promoção do crescimento vegetal e no controle de fitopatógenos, vem sendo muito estudada no Brasil e no mundo, como uma alternativa ambientalmente mais sustentável para o aumento da produtividade de diversas culturas de importância econômica (CARRER et al., 2008).

Dentre os microrganismos benéficos na agricultura, têm-se as actinobactérias que são bactérias Gram-positivas (SIQUEIRA & FRANCO, 1998) pertencentes à Classe Actinobacteria (STACKEBRANDT et al., 1997). Este importante grupo de microrganismos comumente isolados do solo é conhecido por sua ampla produção de metabólitos secundários, entre eles os antibióticos, enzimas extracelulares, inibidores enzimáticos e fitohormônios promotores de crescimento vegetal (SHAHIDI et al., 2004; LI et al., 2008).

O gênero *Streptomyces* spp. contém o maior número de espécies identificadas, devido à ação no controle de fitopatógenos, à grande diversidade de metabólitos secundários e pela elevada capacidade competitiva por substratos (KIM et al., 2004; INBAR et al., 2005).

Durante o processo de compostagem, os estreptomicetos atuam na degradação de moléculas complexas, especialmente celulose, lignocelulose, xilana e lignina, presentes em abundância na biomassa vegetal (PETROSYAN et al., 2003; DING et al., 2004; PELÁEZ, 2006). Além da atuação na decomposição

da matéria orgânica, estes microrganismos apresentam grande potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos (THIRUP et al., 2001; HOSTER et al., 2005), devido à produção de inúmeros metabólitos bioativos, incluindo antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana (SHAHIDI BONJAR et al., 2004).

Isolados de actinobactérias tem demonstrado capacidade de promover o crescimento e a melhoria do estado nutricional de plantas de tomateiro, em solo estéril (SOARES et al., 2010). Trabalhos realizados por Paixão et al., (2008) com isolados de estreptomicetos em mudas micropropagadas de bananeira, demonstraram o potencial destes microrganismos como agentes de biocontrole e promoção de crescimento vegetal. Segundo estes autores, a promoção de crescimento de mudas de bananeira pode ser atribuída à capacidade de solubilização de fosfatos, a enzimas que atuam na mineralização dos compostos orgânicos do substrato e/ou a substâncias reguladoras de crescimento produzidas pelos estreptomicetos.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de actinobactérias quanto à produção de enzimas extracelulares, avaliar o potencial de colonização radicular, a densidade populacional dos isolados introduzidos no substrato e o potencial desses microrganismos para a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira 'Grande Naine' e 'Maravilha', consideradas de grande valor comercial.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1) Seleção dos isolados de actinobactérias

Inicialmente foram pré-selecionados 21 isolados de actinobactérias, provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB. Esta pré-seleção foi baseada em trabalhos anteriores que os indicam como promissores para biocontrole e promoção de crescimento do tomateiro, bananeira, girassol, pinhão manso e mamoneira (SOUZA et al., 2006; PAIXÃO, 2008; BRITO, 2010). As actinobactérias foram

codificadas como: AC 02, AC 12, AC 16, AC 19, AC 21, AC 22, AC 26C, AC 26L, AC 28, AC 30, AC 34, AC 39, AC 42, AC 45, AC 46, AC 49, AC 50, AC 52, AC 92, AC 103 e AC 147.

2.2) Colonização radicular *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira

Mudas micropropagadas de bananeira das cultivares 'Grande Naine' e 'Maravilha', adquiridas da Empresa Campo, localizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia, medindo entre 2,5 e 3,0 cm de altura, em fase de enraizamento, foram transferidas, com auxílio de uma pinça estéril, para tubos de ensaio (uma planta por tubo), contendo meio de cultura ágar-água com 0,6% de ágar (Figura 1). Com auxílio de uma alça de platina, fez-se a raspagem das colônias dos 21 isolados de actinobactérias, crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura sólido arginina glicerol sais minerais (AGS) (POTER et al, 1960), por 10 dias a temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as raízes foram inoculadas com as células oriundas da raspagem das colônias de actinobactérias, colocando-se o inóculo próximo à superfície do meio ágar-água em contato com as raízes das mudas micropropagadas. Após inoculação, as raízes foram incubadas a temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo mantidas na bancada do laboratório e observados diariamente para avaliação visual do crescimento das actinobactérias na superfície das raízes.

Segmentos de raízes de mudas micropropagadas de bananeira foram transferidas para placas de Petri contendo meio AGS sólido. Posteriormente, com auxílio de uma alça de platina, a extremidade correspondente a região de corte da raiz de bananeira foi inoculada com células de actinobactérias, obtidas por meio de raspagem de colônias, multiplicadas conforme descrito acima. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 38 dias, sendo observadas diariamente para o crescimento das actinobactérias ao longo do comprimento da raiz (Figura 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, duas variedades de bananeira, 21 isolados de actinobactérias e uma testemunha não inoculada, totalizando 210 plantas.

Foto: Jacqueline L. D. Estevam

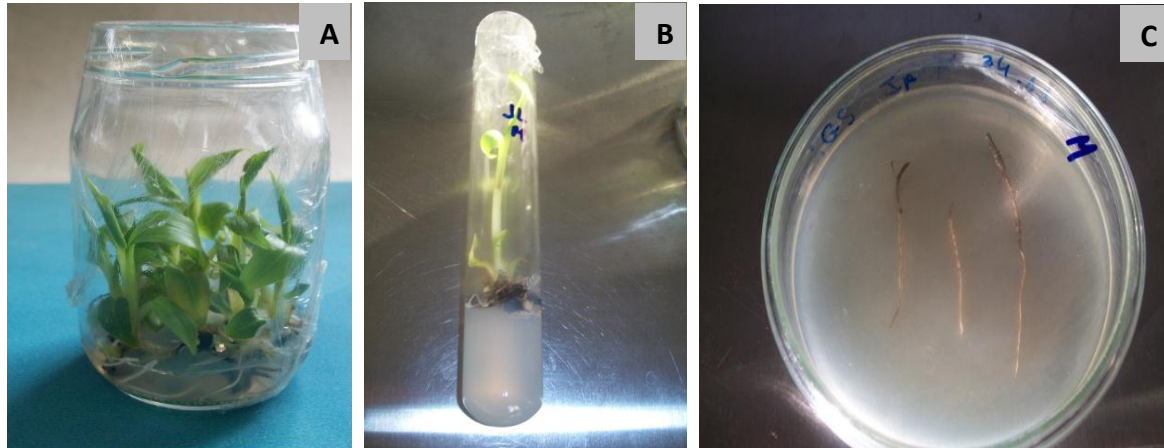


Foto: Jacqueline L. D. Estevam

FIGURA 1: (A) Mudanças micropropagadas de bananeira em fase de enraizamento. (B) Mudanças micropropagadas de bananeira transferidas para tubo de ensaio contendo meio ágar-água a 0,06%. (C) Raízes de mudanças micropropagadas de bananeira transferidas para placa de Petri contendo meio AGS sólido.

2.3) Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias

2.3.1) Produção de Celulase

A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita por LEWIS (1988). Os isolados foram multiplicados em meio mínimo de sais (TUIE, 1969), suplementado com celulose microcristalina como única fonte de carbono e as culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 28°C durante 15 dias. Após este período, foram adicionados 10mL da solução vermelho congo 0,5% em cada placa, sendo estas incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, removeu-se o excesso da solução de vermelho congo e adicionou-se 10ml da solução salina (NaCl a 1M) em cada placa, sendo estas mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a remoção da solução salina, observou-se a formação ou não de uma zona de hidrólise de coloração alaranjada em torno das colônias, indicando a atividade celulolítica dos isolados.

2.3.2) Produção de Xilanase

A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita por LEWIS (1988). Os isolados foram multiplicados em meio mínimo de sais (TUIE, 1969), suplementado com xilana (Sigma) como única fonte de carbono e as placas

incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 28°C durante 15 dias. Após este período, foram adicionados 10mL da solução vermelho congo 0,5% em cada placa, sendo estas incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, removeu-se o excesso da solução de vermelho congo e adicionou-se 10ml da solução salina (NaCl a 1M) em cada placa, sendo estas mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a remoção da solução salina, observou-se a formação ou não de uma zona de hidrólise de coloração alaranjada em torno das colônias, indicando a atividade xilanolítica dos isolados.

2.3.3) Solubilização de Fosfato Inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi determinada de acordo com a metodologia proposta por KATZNELSON & BOSE (1959). Os isolados foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja agar (10%) acrescido de CaHPO_4 e as placas incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. por sete dias. Após este período, a solubilização de fosfato foi detectada pela formação de uma zona de solubilização de aspecto opaco em torno das colônias dos isolados de actinobactérias.

2.3.4) Produção de Ácido Indolacético

A capacidade de produção de ácido indolacético foi determinada segundo o método proposto por BRIC et al. (1991). As actinobactérias foram crescidas em meio triptocaseína de soja (10%), acrescido de 5 mM de L-triptofano. Posteriormente, as colônias foram cobertas por uma membrana de nitrocelulose e as placas incubadas em câmara B.O.D., a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias. Após incubação, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski (GORDON & WELBER, 1951). Os isolados que formaram um halo avermelhado na membrana, no período de 30 minutos, foram considerados produtores de ácido indolacético.

2.4) Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira em substrato com actinobactérias

2.4.1) Produção de inóculo de actinobactérias

Para a produção de inóculo, os isolados de actinobactérias foram multiplicados em meio de cultura sólido AGS (POTER et al., 1960), em placas de Petri e incubados por 10 a 12 dias a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento tipo B.O.D. Posteriormente, discos da cultura de actinobactérias foram transferidos para porções de 50g de arroz umedecido e esterilizado, em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, conforme descrito por SOARES et al., (2007) e o arroz inoculado foi incubado por 14 dias a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O arroz colonizado pelas actinobactérias foi utilizado para inoculação do substrato. A suspensão do inóculo foi preparado misturando-se 20g de arroz com 250 mL de água esterilizada, em um saco de plástico, sendo este agitado manualmente, por 2 a 5 minutos, para remoção das estruturas das actinobactérias dos grãos de arroz. Em seguida, a suspensão foi filtrada com gaze para remoção dos grãos de arroz e utilizada para inoculação do substrato.

2.4.2) Produção de substrato colonizado por actinobactérias

O substrato Vivatto Slim® não foi esterilizado para manter as suas características químicas, físicas e biológicas. Para inoculação do substrato, a suspensão de inóculo do isolado de actinobactéria foi preparada na proporção de 20 g de arroz colonizado para 16 L de substrato para, após o período de incubação, estes serem utilizados para transplante das mudas micropropagadas de bananeira.

Em sacos de polietileno, foram colocados 16 L do substrato Vivatto Slim®, sendo cada alíquota de substrato inoculada com a suspensão de um isolado de actinobactéria. Após a adição da suspensão de actinobactérias, preparada conforme descrito acima, os sacos de polietileno contendo o substrato foram agitados manualmente para distribuição e homogeneização do inóculo. Os substratos inoculados foram mantidos nos sacos de polietileno e incubados por um

período de quarenta e cinco dias a temperatura ambiente, mantendo-se a umidade constante, com adição de água esterilizada. O tratamento testemunha foi formado por substrato incubado nas mesmas condições de umidade e temperatura, mas sem inoculação com actinobactérias.

Após o período de incubação, a população de actinobacterias no substrato inoculado foi quantificada, utilizando-se a técnica de diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura meio AGS sólido (*Arginine-Mineral Salt Agar*). Amostras em triplicata de 10g de substrato foram transferidas para frascos de Erlenmeyer com 90 ml de solução salina (NaCl a 0,85%) estéril e agitadas por 20 minutos em agitador orbital. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina estéril, obtendo-se diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . Em seguida, foram realizados os plaqueamentos de 100 μ l das diluições 10^{-2} a 10^{-4} em meio AGS sólido, com três repetições para cada diluição, sendo o inóculo espalhado com alça de Drigalski esterilizada por flambagem. O meio de cultura recebeu ciclohexamida na concentração de 100 μ g/ml⁻¹ para inibição do crescimento de fungos. Para o crescimento das actinobactérias, as placas foram incubadas por 5 a 7 dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento tipo B.O.D.

A população de actinobactérias no substrato foi estimada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e o cálculo com base na seguinte fórmula: UFC/g solo seco = $N \times F \times Y/g$ solo seco, sendo: N = média do número de colônias das três repetições, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 μ l de suspensão), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em $\log(x + 1)$, em que x corresponde ao número de UFC. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A quantificação da densidade populacional de actinobactérias foi realizada após o período de 45 dias de incubação do substrato e repetida no final do experimento, na época da coleta das mudas de bananeira, que correspondeu a 45 dias após o plantio das mudas no substrato tratado com as actinobactérias. Como o substrato utilizado no tratamento testemunha não era esterilizado, também foi

determinada a população de actinobactérias nesse substrato, considerando que o substrato possui uma microbiota nativa.

2.5) Crescimento de mudas de bananeira em substrato com actinobactérias

Para avaliar o efeito da inoculação e incubação do substrato Vivatto Slim® com isolados de actinobactérias no crescimento de mudas micropropagadas de bananeira foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação. No primeiro experimento foram avaliados nove isolados provenientes da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, codificados como AC 16, AC 26C, AC 26L, AC 30, AC39, AC 50, AC 52, AC 92 e AC 147. Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos inteiramente casualizados com dez tratamentos, sendo nove isolados de actinobactérias e uma testemunha não inoculada, com quatro repetições. A testemunha foi composta por substrato não esterilizado, incubado com água, sem inoculação com actinobactérias.

No segundo experimento foram avaliados treze isolados de actinobactérias codificados como AC 02, AC 12, AC 19, AC 21, AC 22, AC 28, AC 34, AC 42, AC 45, AC 46, AC 49, AC 52 e AC 103. O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial, com quatorze tratamentos, sendo treze isolados de actinobactérias e uma testemunha, com quatro repetições. A testemunha foi composta pelo mesmo substrato, incubado com água, sem inoculação com actinobactérias.

Após os 45 dias de incubação, os substratos foram colocados em sacos de muda pretos de polietileno (15 x 0,9 cm), colocando-se 1 litro de substrato por saco de muda.

Para ambos os experimentos, as mudas micropropagadas de bananeira foram transplantadas, colocando uma muda por saco. As mudas apresentavam uniformidade no tamanho entre si e entre as duas variedades 'Grande Naine' e 'Maravilha' utilizadas nos experimentos (Figura 2).

As mudas foram mantidas em condições de casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente e foram coletadas aos quarenta e cinco dias após o transplante, avaliando-se a altura das plantas e diâmetro do pseudocaule. Em seguida, separou-se a parte aérea das raízes das plantas, sendo estas lavadas em

água corrente. Determinou-se a massa fresca da parte aérea e da raiz e, posteriormente foram colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, por três dias, para determinação da massa seca da parte aérea e das raízes. Foi realizada a moagem e digestão sulfúrica da parte aérea das plantas para a determinação de P e K (EMBRAPA, 1999). O N foi determinado após digestão em ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (THOMAS et al.,1967). Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).



FIGURA 2: Mudanças de bananeira micropropagadas produzidas na Empresa Campo, Cruz das Almas-Ba. **(A)** Mudanças micropropagadas de bananeira cultivar 'Maravilha', medindo 8 cm de altura,. **(B)** Mudanças micropropagadas de bananeira - cultivar 'Grande Naine', medindo 8 cm de altura.

2.6) Avaliação das características químicas do substrato

As análises químicas das amostras dos substratos, após 45 dias de incubação com actinobactérias e do substrato sem inoculação foram realizadas no Laboratório de Solos da empresa CAMPO - ANÁLISES AGRÍCOLAS E AMBIENTAIS. O P, K, Cu, Fe e Zn disponíveis foram extraídos por Mehlich 1 (EMBRAPA, 1997). A extração de S foi realizada em solução de fosfato monobásico de potássio. A extração do Ca e Mg disponíveis foi realizada em

cloreto de potássio 1mol/L. O boro foi extraído com água quente. Todos os teores de nutrientes disponíveis foram determinados por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido de argônio. Os teores de nutrientes do substrato Vivatto Slim® utilizado neste trabalho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização química do substrato Vivatto Slim® utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valor
pH (CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹)		5,1
Umidade a 65°C	%	39,0
Relação C/N		61,1
Carbono Orgânico	%	27,9
Matéria Orgânica	%	48,1
N –total	g/kg	2,8
P-total	mg/dm ³	1677,0
K	cmolc/dm ³	6,2
Ca	cmolc/dm ³	23,7
Mg	cmolc/dm ³	140,7
S	mg/dm ³	2300,0
B	mg/dm ³	28,0
Zn	mg/dm ³	40,0
Fe	mg/dm ³	6953,0
Mn	mg/dm ³	215,8
Cu	mg/dm ³	8,0
Ni	mg/dm ³	140,0

Extratores: P, K, Ni e micronutrientes: Mehlich I; S: Fosfato monobásico de cálcio; B: água quente.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Colonização radicular *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira.

As actinobactérias foram capazes de colonizar o sistema radicular das duas cultivares de bananeira no ambiente *in vitro*, com exceção do isolado AC 12. A utilização do meio ágar-água pressupõe que os exsudados radiculares foram a única fonte de nutrientes.

A avaliação da colonização das raízes em placas de Petri com meio AGS, foi avaliada com o auxílio de uma régua, medindo a área colonizada e o

comprimento total de cada raiz. Para melhor observação, as raízes foram retiradas da placa de Petri e colocadas sobre papel toalha esterilizado.

Todos os isolados colonizaram as raízes, apresentando variações entre as cultivares 'Maravilha' e 'Grande Naine' (Tabelas 2 e 3). A colonização microbiana pode variar em função da espécie vegetal, da cultivar vegetal e do tipo de solo, devido à seleção e estímulo de determinados microrganismos rizosféricos. É necessário verificar se a colonização radicular por actinobactérias observada *in vitro*, também ocorre nas condições de casa de vegetação e campo. Trabalhos com isolados de estreptomicetos demonstraram variabilidade quanto a colonização radicular de plantas de tomate e pimentão em solo estéril (GAVA, 1998). Segundo CRAWFORD et al, (1993), as actinobactérias são um grupo promissor de microrganismos colonizadores de raízes e importantes agentes de controle biológico de patógenos radiculares.

Tabela 2. Colonização radicular *in vitro* por actinobactérias em mudas micropropagadas de bananeira Maravilha e Grande Naine, mantidas em ágar-água.

Isolados de Actinobactérias	Colonização radicular de bananeiras	
	Maravilha	Grande Naine
Controle	+	+
AC 02	+	+
AC 12	-	-
AC 16	+	+
AC 19	+	+
AC 21	-	+
AC 22	+	+
AC 26C	+	+
AC 26L	+	+
AC 28	+	+
AC 30	+	+
AC 34	+	-
AC 39	+	+
AC 42	+	+
AC 45	+	+
AC 46	+	+
AC 49	+	+
AC 50	+	+
AC 52	+	+
AC 92	+	+
AC 103	+	+
AC 147	+	+

Os sinais indicam resposta positiva (+) negativa (-) em relação a colonização radicular nas cultivares de bananeira pelos isolados de actinobactérias.

Tabelas 3. Percentagem de colonização radicular por actinobactérias em pedaços de raízes de bananeira micropropagada, transferidos para placa de Petri com meio Argemina Glicerol Sólido (AGS).

Isolados de Actinobactérias	Percentagem de colonização radicular	
	Maravilha	Grande Naine
AC 02	80%	65%
AC 12	80%	100%
AC 16	100%	100%
AC 19	100%	100%
AC 21	80%	55%
AC 22	80%	80%
AC 26C	100%	100%
AC 26L	100%	100%
AC 28	80%	80%
AC 30	60%	80%
AC 34	100%	25%
AC 39	55%	55%
AC 42	100%	100%
AC 45	100%	100%
AC 46	55%	55%
AC 49	100%	100%
AC 50	85%	100%
AC 52	100%	100%
AC 92	100%	100%
AC 103	100%	55%
AC 147	100%	100%

Verificou-se que, embora os valores de colonização *in vitro* tenham sido relativamente altos para alguns tratamentos, nem sempre refletiram no crescimento da parte aérea observado nos experimentos com mudas de bananeira crescidas em substrato tratado com as actinobactérias. Como exemplo, pode se citar o tratamento com o isolado AC 26L que, apesar de colonizar toda a superfície radicular em teste *in vitro*, não se destacou como promissor para promoção do crescimento da parte aérea para a cultivar “Maravilha” (Figura 4). Entretanto, este isolado promoveu maior teor de P na parte aérea (Tabela 06 e 07). Embora o fósforo não esteja entre os macronutrientes mais absorvidos pela bananeira (BORGES & SILVA, 1995), os trabalhos realizados com inoculação de FMAs tem mostrado grandes respostas na absorção de fósforo (LIN & FOX, 1987; MONTEIRO, 1991; DECLERCH et al., 1994 e 1995).

3.2 Caracterização fisiológica das actinobactérias

Entre os 21 isolados de actinobactérias testados, 17 apresentaram atividade celulolítica, 8 apresentaram atividade xilanolítica, 19 apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. Nenhum dos isolados apresentou capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 4).

Tabela 4. Produção de enzimas extracelulares*, de ácido indolacético (AIA) e capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados de actinobactérias.

Isolado de actinobactérias	Celulase	xilanase	Solubilização de fosfato	Ácido Indolacético
AC 02	-	-	-	+
AC 12	+	+	-	+
AC 16	+	-	-	+
AC 19	+	-	-	+
AC 21	-	-	-	+
AC 22	-	-	-	+
AC 26C	+	+	-	+
AC 26L	+	+	-	+
AC 28	+	-	-	+
AC 30	-	-	-	+
AC 34	+	-	-	-
AC 39	+	+	-	-
AC 42	+	+	-	+
AC 45	+	-	-	+
AC 46	+	-	-	+
AC 49	+	-	-	+
AC 50	+	-	-	+
AC 52	+	-	-	+
AC 92	+	+	-	+
AC 103	+	+	-	+
AC 147	+	+	-	+

*O sinal positivo indica produção e o negativo a não produção das enzimas extracelulares e ácido indolacético.

A celulose é um polímero abundante na biomassa dos vegetais, sendo degradado por inúmeros microrganismos produtores de celulase. Ao atacarem a molécula de celulose, os microrganismos a transformam em glicose livre (MURASHIMA et al., 2002). Os microrganismos com capacidade de degradação deste composto podem ter um importante papel na decomposição da matéria

orgânica do solo ou de substratos de crescimento de plantas, disponibilizando nutrientes e beneficiando o desenvolvimento das plantas. Estes podem também agir como agentes de biocontrole de fitopatógenos que possuem celulose na sua parede celular (BERG et al., 2000) Dentre as importantes características dos actinomicetos, enumera-se a capacidade de degradação de moléculas complexas, especialmente a celulose, lignina e xilana, fazendo com que tenham um papel importante nos processos de compostagem (RAMIREZ et al., 2003).

A xilana é o principal polímero constituinte do complexo hemicelulolítico (HALTRICH, 1996). Microrganismos capazes de produzir xilanase são importantes no processo de decomposição de compostos orgânicos, podendo agir na mineralização de nutrientes e no maior desenvolvimento de plantas (OLIVEIRA et al., 2003).

A atividade xilanolítica, celulolítica e quitinolítica *in vitro* de diversos isolados de actinobactérias foi relatada por SOUZA et al, (2006). Estes autores obtiveram resultados significativos de promoção de crescimento e controle do nematóide *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro produzidas em substrato incubado com actinomicetos, mas não observaram correlação entre o efeito benéfico das actinobactérias e a produção dessas enzimas.

Com relação a produção do ácido indolacético, 90,4% dos isolados de actinobactérias demonstraram ser produtores desse hormônio que atua no crescimento vegetal. O ácido indolacético afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERE et al., 1986), deixando as plantas com menor suscetibilidade a escassez de nutrientes e ao déficit hídrico (CATTELAN, 1999).

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas. As auxinas são reconhecidas como o principal hormônio vegetal encontrado na natureza, sendo o ácido 3-indolacético (AIA) o composto mais produzido (RADWAN et al., 2005). A síntese dos fitohormônios por bactérias associadas a plantas é uma das formas mais importantes de interação planta-bactéria, causando modificações na morfologia das raízes, influenciando na absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, favorecendo o crescimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007)

3.3 Quantificação das actinobactérias no substrato Vivatto Slim®

Em relação à população das actinobactérias no substrato Vivatto Slim®, verificou-se em ambos experimentos, após 45 dias de inoculação e incubação do substrato, antes do transplante das mudas e na época da coleta das mudas, que correspondeu a 45 após o transplante, um aumento na densidade populacional, significativamente superior ao tratamento testemunha (não inoculado), para todos os isolados de actinobactérias (Tabela 5). No primeiro experimento, o substrato não inoculado apresentou uma população de actinobactérias de $1,7 \times 10^4$ UFC g⁻¹ antes do plantio e de $1,8 \times 10^4$ UFC g⁻¹ a $1,9 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de substrato após o plantio para cultivar Grande Naine e Maravilha, respectivamente. A população das actinobactérias no substrato inoculado variou entre $1,92 \times 10^6$ e $2,68 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de substrato, para aquele cultivado com a cultivar Grande Naine e entre $1,38 \times 10^6$ a $2,82 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de substrato para aquele cultivado com a cultivar Maravilha, após a coleta das plantas, com destaque para o isolado AC 92, que apresentou uma população de actinobactérias superior aos demais tratamentos, para ambas as variedades (Tabela 5). No segundo experimento, as densidades populacionais de actinobactérias no substrato variaram entre $1,17 \times 10^4$ a $2,20 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de substrato, após os 45 dias de incubação (antes do transplante) e de $1,53 \times 10^5$ a $2,90 \times 10^6$ no substrato com a cultivar Grande Naine e de $1,58 \times 10^5$ a $2,90 \times 10^5$ no substrato com a cultivar Maravilha (Tabela 5), não ocorrendo diferenças estatísticas significativas entre as variedades, em ambos experimentos, inoculados e incubados, quando comparados com o substrato não inoculado.

Estes resultados indicam que as actinobactérias cresceram e colonizaram o substrato e o crescimento depende da variedade da planta, do isolado de actinobactéria e da capacidade deste em utilizar os nutrientes desse substrato e crescer nessas condições de cultivo. A colonização do substrato por actinobactérias é importante, pois propicia a competição por nicho e o seu estabelecimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal. A inoculação do substrato antes do plantio pode promover a estabilização da comunidade de rizobactérias, e isto está relacionada à necessidade de determinado intervalo de tempo para ocorrer a estabilização da população de microrganismo benéfico (SHISHIDO e CHANWAY, 2000).

Tabela 5. Densidade populacional de actinobactérias cultivadas no substrato Vivatto Slim® aos 45 dias após incubação e após a coleta das mudas de bananeira: cultivares ‘Maravilha’ e ‘Grande Naine’.

EXPERIMENTO 1

Tratamentos	Variedades de bananeira		
	Antes do plantio	‘Grande Naine’	‘Maravilha’
		Após coleta	Após coleta
Testemunha	1,70 x 10 ⁴ Ad	1,80 x 10 ⁴ Ad	1,90 x 10 ⁴ Ae
AC 16	9,20 x 10 ⁵ Bb	2,36 x 10 ⁶ Ab	2,08 x 10 ⁶ Ac
AC 26C	1,12 x 10 ⁶ Bc	1,94 x 10 ⁶ Ac	2,01 x 10 ⁶ Ac
AC 26L	2,04 x 10 ⁶ Bb	2,67 x 10 ⁶ Ab	2,35 x 10 ⁶ Ab
AC 30	1,05 x 10 ⁶ Bc	1,95 x 10 ⁶ Ac	1,38 x 10 ⁷ Ad
AC 39	1,07 x 10 ⁶ Bc	1,96 x 10 ⁶ Ac	1,51 x 10 ⁶ Ad
AC 50	1,62 x 10 ⁶ Bb	2,22 x 10 ⁶ Ab	2,04 x 10 ⁶ Ac
AC 52	2,18 x 10 ⁶ Bb	2,49 x 10 ⁶ Ab	2,45 x 10 ⁶ Ab
AC 92	2,68 x 10 ⁶ Aa	2,82 x 10 ⁶ Aa	2,80 x 10 ⁶ Aa
AC 147	1,92 x 10 ⁶ Bb	2,28 x 10 ⁶ Ab	2,28 x 10 ⁶ Ac

EXPERIMENTO 2

Tratamentos	Variedades de bananeira		
	Antes do plantio	Grande Naine’	‘Maravilha’
		Após coleta	Após coleta
Testemunha	1,70x 10 ⁴ Ad*	1,70 x 10 ⁴ Ad	1,70 x 10 ⁴ Ad
AC 02	1,42 x 10 ⁶ Bb	2,66 x 10 ⁶ Aa	2,28 x 10 ⁶ Aa
AC 12	1,09 x 10 ⁶ Bc	2,00 x 10 ⁶ Ab	2,08 x 10 ⁶ Ab
AC 19	9,30 x 10 ⁵ Bb	1,53 x 10 ⁶ Ac	1,58 x 10 ⁶ Ac
AC 21	1,05 x 10 ⁶ Bc	2,32 x 10 ⁶ Aa	2,43 x 10 ⁶ Aa
AC 22	1,07 x 10 ⁶ Bc	2,27 x 10 ⁶ Aa	2,57 x 10 ⁶ Aa
AC 28	1,93 x 10 ⁶ Bb	2,44 x 10 ⁶ Aa	2,15 x 10 ⁶ Ab
AC 34	2,18 x 10 ⁶ Bb	2,58 x 10 ⁶ Aa	2,90 x 10 ⁶ Aa
AC 42	2,03 x 10 ⁶ Ba	2,90x 10 ⁶ Aa	2,90x 10 ⁶ Aa
AC 45	1,92 x 10 ⁶ Bb	2,16 x 10 ⁶ Ab	2,09 x 10 ⁶ Ab
AC 46	1,08 X 10 ⁶ Bc	2,68 x 10 ⁶ Aa	2,58 x 10 ⁶ Aa
AC 49	1,94 X 10 ⁶ Bc	2,29 x 10 ⁶ Aa	2,00 x 10 ⁶ Ab
AC 52	2,20 X 10 ⁶ Bb	2,59 x 10 ⁶ Aa	2,89 x 10 ⁶ Aa
AC 103	1,93 x 10 ⁶ Bb	2,43 x 10 ⁶ Aa	2,30 x 10 ⁶ Aa

*Letras maiúsculas comparam o efeito do período de incubação (aos quarenta e cinco dias após incubação e após a coleta do experimento) para o mesmo isolado de actinobactéria e para mesma variedade de banana. Letras minúsculas comparam o efeito dos isolados de actinobactéria entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SOUSA (2006), avaliando o tempo de incubação do substrato de produção de mudas com isolados de actinobactérias, demonstrou a necessidade de um período de incubação para que houvesse o efeito benéfico das actinobactérias na promoção de crescimento de tomateiro. Este período está provavelmente associado ao ciclo de vida das actinobactérias e a produção de enzimas extracelulares envolvidas na decomposição de compostos orgânicos presentes no substrato e na liberação de nutrientes para a planta (SOUSA, 2006; JAMES et al.,1991).

3.4 Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira no substrato Vivatto Slim® com isolados de actinobactérias

No primeiro experimento, foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as cultivares 'Maravilha' e 'Grande Naine' com relação a altura da planta, massa fresca e seca da parte aérea.

Foram obtidos incrementos na altura das plantas da cultivar 'Grande Naine', de até 55,8%, para todos os isolados de actinobactérias testados, em relação às mudas produzidas no substrato não inoculado. Entretanto, para a cultivar 'Maravilha' com relação à massa fresca da parte aérea, também houve diferença significativa entre as cultivares, com destaque para o substrato inoculado com os isolados AC 26L, AC 30, AC 50 e AC 52, que promoveram um incremento de até 32,7% para a cultivar 'Grande Naine'. Para massa seca da parte aérea, os isolados AC 30, AC 147, AC 50, AC 26C, AC 92 e AC 52 mostraram-se bastante promissores, proporcionando incrementos de até 38,2% para a cultivar 'Grande Naine'(Figura 3). Em relação a massa fresca e seca da raiz, não houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos e nem entre as cultivares "Maravilha" e "Grande Naine".

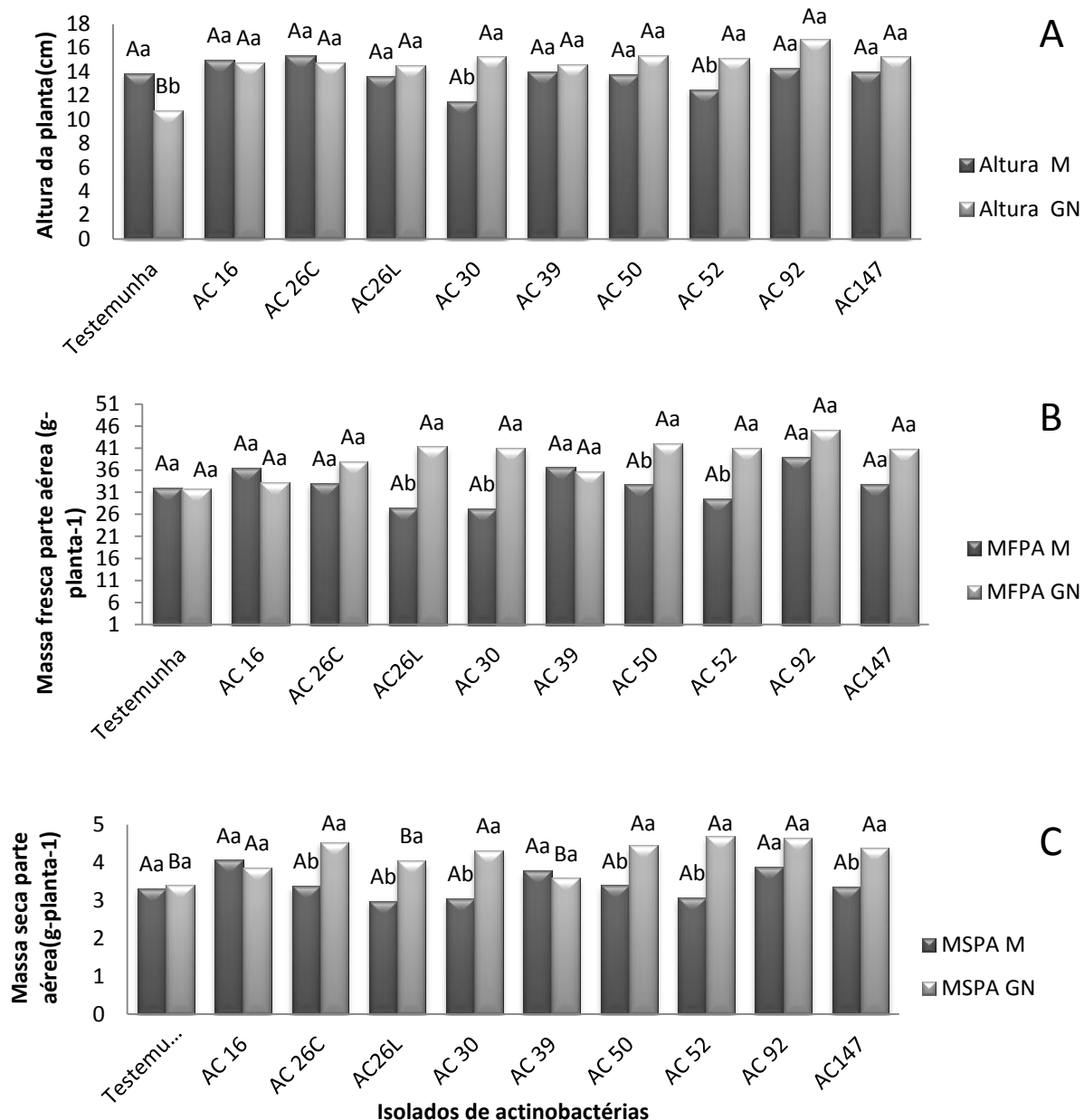


Figura 3. Altura (A), massa fresca (B) e massa seca (C) da parte aérea de mudas micropropagadas de bananeira cultivadas em substrato Vivatto Slim® inoculado e incubado por 45 dias com actinobactérias. O tratamento testemunha foi formado por mudas micropropagadas de bananeira plantadas em substrato sem inoculação com actinobactérias. As avaliações foram feitas após 45 dias de instalação do experimento. Letras maiúsculas comparam o efeito na promoção de crescimento entre os isolados para mesma cultivar e letras minúsculas comparam o efeito de promoção de crescimento para o mesmo isolado entre as duas cultivares. Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

No segundo experimento, observou-se que a cultivar Grande Naine apresentou melhor crescimento para altura da planta, com destaque para o

isolado AC 28 que se mostrou mais promissor para o crescimento da variedade Grande Naine do que para a Maravilha.

Para diâmetro do pseudocaule, verificou-se que os substratos inoculados com os isolados AC 02, AC 22, AC 34, AC 42 e AC 45, proporcionaram o crescimento de mudas com diâmetro inferior ao daquelas produzidas no substrato não inoculado (testemunha) e os substratos inoculados com os isolados AC 12, AC 19, AC 21, AC 28, AC 46, AC 52 e AC 103 promoveram diferenças significativas entre as cultivares de bananeira, sendo que os maiores incrementos foram observados para cultivar Grande Naine (Figura 5).

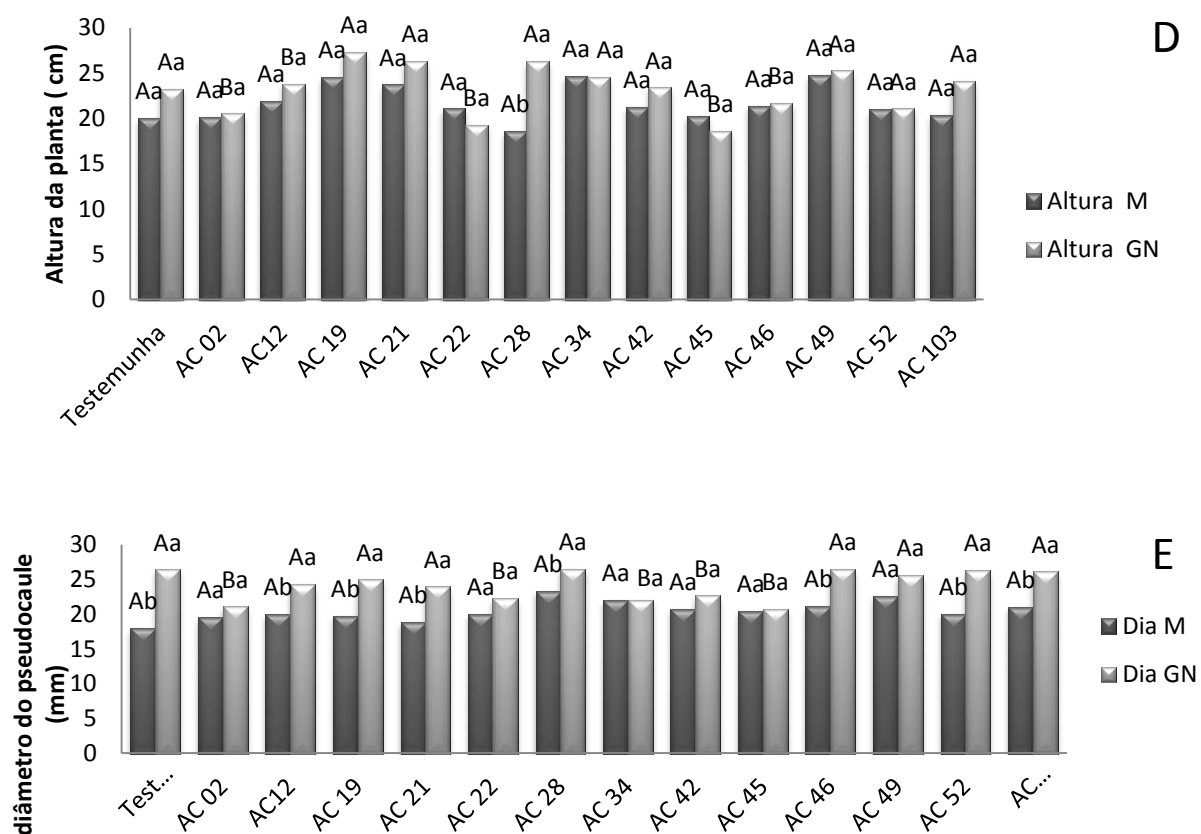


Figura 4. Altura da planta (**D**) e diâmetro do caule (**E**) de mudas de bananeira cultivadas em substrato Vivatto Slim®, inoculado e incubado por 45 com actinobactérias. O tratamento testemunha foi formado por mudas transplantadas para substrato sem inoculação com actinobactérias. As avaliações foram feitas após 45 dias de instalação do experimento. Letras maiúsculas comparam o efeito na promoção de crescimento entre os isolados para mesma cultivar e letras minúsculas comparam o efeito de promoção de crescimento para o mesmo isolado entre as duas cultivares Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Para massa fresca da parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a cultivar ‘Maravilha’, em relação a testemunha não inoculada. Entretanto, para a cultivar ‘Grande Naine’ o substrato inoculado e incubado com os isolados AC 02, AC 21, AC 34 e AC 45 causou um decréscimo no crescimento das mudas, quando comparado com a testemunha. Entretanto, para massa fresca da raiz, os isolados AC 12, AC 21, AC 34 e AC 42 proporcionaram incrementos significativos para a cultivar ‘Maravilha’ e os isolados AC 19, AC 46, AC 49 e AC 103 para a cultivar ‘Grande Naine’, quando comparados com a testemunha sem actinobactérias (Figura 5).

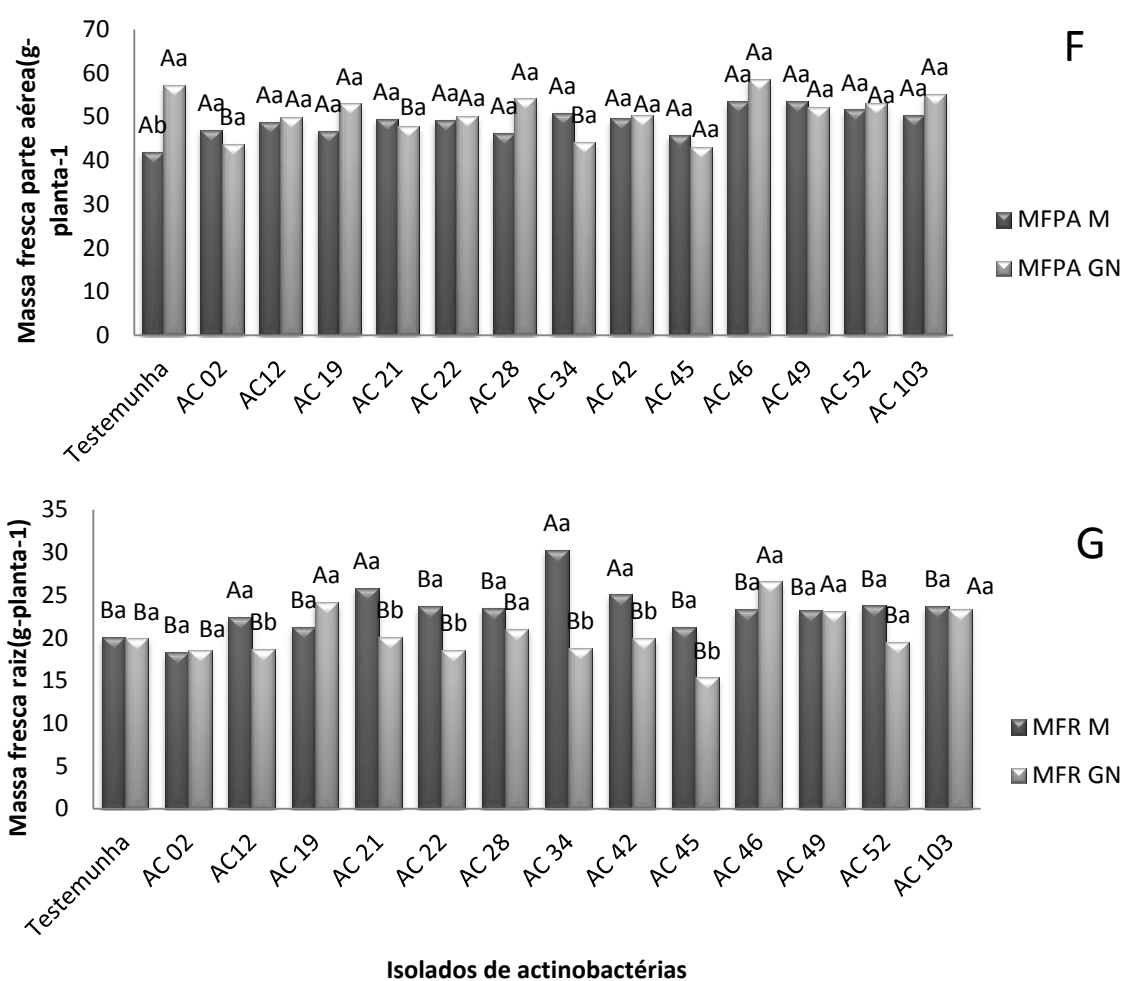


Figura 5. Massa fresca da parte aérea (**F**) e massa fresca da raiz (**G**) de mudas de mudas de bananeira cultivadas em substrato Vivatto Slim®, inoculado e incubado por 45 com actinobactérias. O tratamento testemunha foi formado por mudas transplantadas para substrato sem inoculação com actinobactérias. As avaliações foram feitas após 45 dias de instalação do experimento. Letras maiúsculas comparam o efeito na promoção de crescimento entre os isolados para mesma cultivar e letras minúsculas comparam o efeito de promoção de crescimento para o mesmo isolado entre as duas cultivares Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

O isolado AC 19 proporcionou um incremento de 92,0 % na massa seca da parte aérea na cultivar ‘Grande Naine’ em relação à testemunha e o AC 46 proporcionou um incremento de 51,9% na cultivar ‘Maravilha’, quando comparada com ‘Grande Naine’. Para massa seca da raiz o AC 12, AC 34, AC 42, AC 52 e AC 103, proporcionaram incrementos significativos na cultivar ‘Maravilha’, com destaque para os isolados, AC 34, AC 52 e AC 12 com 95,75%, 79,39% e 52% respectivamente (Figura 6).

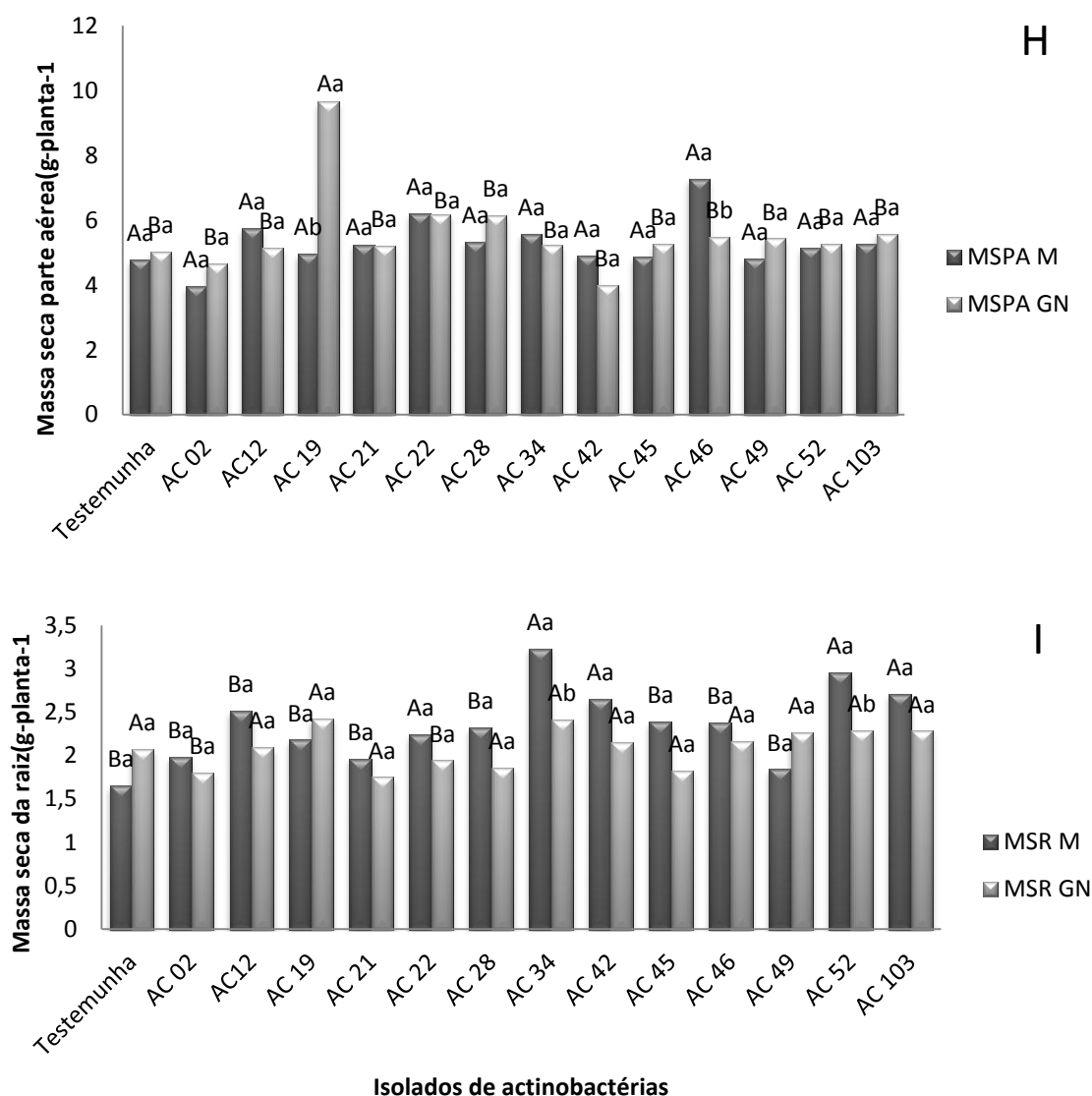


Figura 6. Massa seca da parte aérea (**H**) e massa seca da raiz (**I**) de mudas de bananeira cultivadas em substrato Vivatto Slim®, inoculado e incubado por 45 com actinobactérias. O tratamento testemunha foi formado por mudas transplantadas para substrato sem inoculação com actinobactérias. As avaliações foram feitas após 45 dias de instalação do experimento. Letras maiúsculas comparam o efeito na promoção de crescimento entre os isolados para mesma cultivar e letras minúsculas comparam o efeito de promoção de crescimento para o mesmo isolado entre as duas cultivares. Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Nos dois experimentos foram verificados que os teores de potássio (K) e fósforo (P) nas folhas de mudas de bananeira apresentaram resultados positivos e significativos ($P \leq 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas para o teor de nitrogênio total (N-total) (Tabela 6).

Tabela 6. Teor de NPK da parte aérea das plantas de bananeira produzidas em substrato Vivatto Slim® inoculados e incubados com isolados de actinobactérias.

EXPERIMENTO 1						
Isolados de actinobacterias	N		P		K	
	g/kg de massa seca da parte aérea*					
	M	GN	M	GN	M	GN
Testemunha	27,19 Aa	25,19 Aa	9,67 Aa	7,73 Bb	16,46 Aa	17,60 Aa
AC 16	26,31 Aa	25,56 Aa	9,16 Ba	9,02 Aa	15,96 Aa	16,97 Aa
AC 26C	23,81 Aa	30,69 Aa	8,78 Bb	8,36 Bb	18,61 Aa	14,69 Bb
AC26L	26,31 Aa	22,69 Aa	10,25 Aa	9,97 Aa	17,34 Aa	16,46 Aa
AC 30	31,56 Aa	26,06 Aa	8,11 Bb	9,24 Aa	16,33 Aa	14,95 Ba
AC 39	23,06 Aa	20,69 Aa	8,78 Ba	9,29 Aa	17,22 Aa	14,44 Bb
AC 50	38,94 Aa	23,31 Ab	9,25 Aa	8,65 Ba	18,11 Aa	13,43 Bb
AC 52	28,31 Aa	40,81 Aa	9,47 Aa	8,12 Bb	18,35 Aa	16,97 Aa
AC 92	27,31 Aa	34,56 Aa	9,55 Aa	9,16 Aa	18,86 Aa	17,85 Aa
AC147	27,69 Aa	26,81 Aa	8,69 Ba	8,53 Ba	17,72 Aa	17,09 Aa

EXPERIMENTO 2						
Isolados de actinobacterias	N		P		K	
	g/kg de massa seca da parte aérea*					
	M	GN	M	GN	M	GN
Testemunha	12,44 Aa	14,69 Aa	11,01 Aa	10,66 Aa	16,46 Aa	13,05 Ab
AC 02	9,19 Aa	8,12 Aa	11,58 Aa	12,45 Aa	14,82 Aa	14,19 Aa
AC12	8,31 Aa	9,81 Aa	10,76 Aa	11,11 Aa	12,55 Aa	13,18 Aa
AC 19	8,25 Aa	8,62 Aa	11,44 Aa	12,56 Aa	14,44 Aa	12,93 Aa
AC 21	8,87 Aa	8,44 Aa	9,62 Aa	12,18 Aa	16,71 Aa	12,93 Ab
AC 22	10,09 Aa	14,01 Aa	10,30 Aa	11,94 Aa	12,80 Aa	14,82 Aa
AC 28	9,51 Aa	11,44 Aa	13,27 Aa	11,27 Aa	16,33 Aa	15,70 Aa
AC 34	14,31 Aa	7,94 Ab	12,15 Aa	11,54 Aa	15,58 Aa	13,56 Aa
AC 42	9,62 Aa	8,31 Aa	12,12 Aa	10,50 Aa	15,96 Aa	14,44 Aa
AC 45	10,12 Aa	9,06 Aa	9,75 Ab	14,15 Aa	15,20 Aa	15,20 Aa
AC 46	9,87 Aa	8,25 Aa	10,38 Aa	10,47 Aa	15,90 Aa	12,67 Aa
AC 49	12,56 Aa	10,87 Aa	11,62 Aa	11,55 Aa	14,69 Aa	12,93 Aa
AC 52	10,94 Aa	9,31 Aa	10,90 Aa	13,01 Aa	16,59 Aa	15,58 Aa
AC 103	12,81 Aa	10,69 Aa	14,00 Aa	12,89 Aa	14,31 Aa	12,08 Aa

*Letras maiúsculas comparam o teor de NPK entre os isolados para mesma cultivar (M- Maravilha e GN – Grande Naine) e letras minúsculas comparam os níveis NPK para o mesmo isolado entre as duas cultivares. Letras iguais, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

O teor de P na parte aérea das plantas variou de 8,11 a 10,25 g/kg⁻¹ e de 8,12 a 9,97 g/kg⁻¹ para as cultivares 'Maravilha' e 'Grande naine', respectivamente, no primeiro experimento, e de 9,62 a 14,59 g/kg⁻¹ para a 'Maravilha' e 10,50 a 13,01 g/kg⁻¹ para a 'Grande Naine' no segundo experimento (Tabela 6). A análise de P da parte aérea e no substrato indica elevado teor de P disponível em todos os tratamentos.

O teor de K na parte aérea das mudas de bananeira foi semelhante entre os tratamentos com isolados de actinobactérias e a testemunha, sendo que a maioria dos tratamentos com isolados de actinobactérias não diferiram estatisticamente da testemunha sem inoculação, no primeiro e no segundo experimento (Tabela 6).

De acordo com BORGES et al. (2002), os teores de nitrogênio para Grande Naine e variedades Prata é de 27- 36 g/kg⁻¹ e 25-29 g/kg⁻¹, respectivamente. No presente trabalho, verificou-se no experimento 1, que o teor de N-total na parte aérea das plantas crescidas nos substratos inoculados e não inoculado, apresentaram valores próximo aos valores encontrados por este autor. No experimento 2, os valores verificados foram abaixo dos valores de referência.

O teor de P em todos os tratamentos e em ambos experimentos ficou acima de 1,6-2,7 g/kg⁻¹ para Grande Naine e 1,5-1,9 para Maravilha, considerados ideais por BORGES et al. (2002), o que pode estar associado ao teor elevado de Mg no substrato, pois este micronutriente auxilia e maximiza a planta a absorção do fósforo do solo, ajudando-o a se movimentar no interior da planta. Alguns autores relatam que substratos orgânicos apresentam composição química variável, chegando a apresentar excessos, carências e desequilíbrios de nutrientes e que o enriquecimento desses substratos, com base em fertilizantes, pode acarretar em problemas nutricionais às mudas (NEVES, et al. 1999).

Altos teores de fósforo no substrato e na matéria seca das mudas cultivadas neste substrato podem ter contribuído para inibir a formação de pêlos radiculares e, conseqüentemente, para a redução na massa das matérias fresca e seca das plantas (Figuras 3 e 5), como observado também por VICENTINI et al. (1996).

Quanto ao K, em todos os experimentos verificaram-se teores inferiores aos considerados adequados para a maioria das culturas. De acordo com

MARSCHNER (1995), concentrações de K entre 20,0 e 50,0 g/kg⁻¹ de massa seca são consideradas adequadas para o crescimento da maioria das plantas. FONTES et al. (2003) e SILVA et al. (2007) mencionam que a bananeira, independentemente da cultivar, extrai maiores quantidades de K que dos demais nutrientes. MALAVOLTA, (2006) destaca que este elemento não depende da decomposição da matéria orgânica para se tornar disponível para as plantas, sendo, portanto, menos significativo o efeito dos actinobactérias na disponibilidade e absorção do potássio.

Estes resultados podem ser justificados devido ao fato da bananeira apresentar pequena absorção de macronutrientes até o quinto mês, em função do lento crescimento, como afirma SAMUELS et al., (1978). Do quinto mês até o florescimento (décimo mês) há um aumento acentuado, com acúmulo significativo de matéria seca e nutrientes. Após o florescimento até a colheita, a absorção de nutrientes é estabilizada (MONTAGUT & PRÉVEL, 1965).

Com referência aos micronutrientes, TWYFORD & WALMSLEY (1968) observaram em banana “Robusta” (AAA), um aumento pequeno na absorção de boro e cobre, após o quinto mês (um a dois meses antes do florescimento), e um aumento acentuado na absorção de zinco, após o início do florescimento (6,5 meses) até a colheita. A maior absorção de macro e micronutrientes ocorre após o quinto mês, quando se verifica maior acúmulo de matéria seca, até o florescimento, estabilizando-se até a colheita, exceto para zinco e potássio, este último por acumular grande quantidade nos frutos.

Em ambos os experimentos do presente trabalho, os teores de macronutrientes na massa seca da parte aérea das plantas cultivadas em substrato inoculado com actinobactérias, foram semelhantes aos observados nas plantas cultivadas no substrato não inoculado, o que pode estar relacionado com a fase inicial de cultivo das mudas de bananeira.

As análises nutricionais indicam que o substrato Vivatto Slim® possui elevados teores de nutrientes (Tabela 7).

Tabela 7. Teores de nutrientes disponíveis do substrato Vivatto Slim® inoculado e incubado com actinobactérias.

EXPERIMENTO 1

Isolado de actinobactérias	P	S	K	Ca	Mg	B	Zn	Fe	Mn	Cu
	-----mg/dm ³ -----			-cmolc/dm ³ -		-----mg/dm ³ -----				
Testemunha	434,7	521,6	1,9	7,4	7,7	4,9	4,6	182,1	62,0	0,6
AC 16	544,5	638,0	2,2	8,8	9,1	5,6	5,2	177,0	64,3	0,5
AC 26C	536,3	688,0	2,0	10,0	9,8	5,7	5,2	126,0	69,3	0,5
AC26L	364,4	647,0	1,0	6,7	7,1		3,6	137,0	35,4	0,6
AC 30	554,0	616,0	2,6	9,8	9,6	5,6	5,4	186,0	71,1	2,4
AC 39	434,7	521,6	1,9	7,4	7,7	4,9	4,6	182,1	62,0	0,6
AC 50	571,5	589,0	2,1	12,1	10,7	4,9	6,0	126,0	77,2	0,6
AC 52	590,0	617,0	2,5	10,5	10,5	4,8	6,6	118,0	86,3	0,5
AC 92	558,7	668,0	2,6	9,5	9,7	5,3	7,8	169,0	61,5	0,5
AC147	468,9	626,0	1,9	8,1	8,2	5,0	4,6	154,0	52,0	0,6

EXPERIMENTO 2

Isolado de actinobactérias	P	S	K	Ca	Mg	B	Zn	Fe	Mn	Cu
	-----mg/dm ³ -----			-cmolc/dm ³ -		-----mg/dm ³ -----				
Testemunha	434,7	521,6	1,9	7,4	7,7	4,9	4,6	182,1	62,0	0,6
AC 02	544,5	638,0	2,2	8,8	9,1	5,6	5,2	177,0	64,3	0,5
AC12	536,3	688,0	2,0	10	9,8	5,7	5,2	126,0	69,3	0,5
AC 19	364,4	647,0	1,0	6,7	7,1	5,8	3,6	137,0	35,4	0,6
AC 21	554,0	616,0	2,6	9,8	9,6	5,6	5,4	186,0	71,1	2,4
AC 22	434,7	521,6	1,9	7,4	7,7	4,9	4,6	182,1	62,0	0,6
AC 28	571,5	589,0	2,1	12,1	10,7	4,9	6	126,0	77,2	0,6
AC 34	590,0	617,0	2,5	10,5	10,5	4,8	6,6	118,0	86,3	0,5
AC 42	558,7	668,0	2,6	9,5	9,7	5,3	7,8	169,0	61,5	0,5
AC 45	468,9	626,0	1,9	8,1	8,2	5,0	4,6	154,0	52,0	0,6
AC 46	493,0	688,0	2,1	8,5	7,0	4,5	5,4	90,0	57,0	0,3
AC 49	425,4	611,0	1,8	7,4	7,8	5,3	5,4	133,0	52,8	0,6
AC 103	432,0	745,0	1,8	10,7	9,0	5,5	5,0	85,0	52,2	0,4

A promoção de crescimento de raízes de bananeira foi observada no primeiro e segundo experimentos, para alguns isolados de actinobactérias. O aumento no diâmetro do pseudocaule e na massa fresca da parte aérea também foi observado para alguns isolados testados nos dois experimentos. Considerando que o substrato, Vivatto Slim® é um substrato rico em nutrientes, sugere-se que as actinobactérias, mesmo crescendo e colonizando o substrato, não promoveram um

efeito significativo na disponibilização dos nutrientes e no crescimento das mudas de bananeira, uma vez que este já é rico em nutrientes, ou as mudas necessitariam de um período maior de crescimento para se observar o efeito desses nutrientes no seu crescimento. O maior crescimento radicular pode ter ocorrido devido à produção de ácido indolacético pelas actinobactérias e/ou pela maior disponibilidade de determinados nutrientes.

De acordo com OLIVEIRA et al., (2003), a produção de ácido indolacético proporciona o melhor desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias e, como consequência, proporcionam a melhor exploração do solo ou substrato pela planta (CATTELAN & HARTEL, 2000). A promoção de crescimento do sistema radicular, principalmente do crescimento de raízes secundárias e aumento dos pêlos radiculares, tem sido observada por diversos autores, em trabalhos com rizobactérias (SILVEIRA, 2001). A síntese de fitohormônios por bactérias associadas a plantas é uma das formas mais importantes de interação planta-bactéria, causando modificações na morfologia das raízes, proporcionando desenvolvimento do sistema radicular e, melhoria na exploração do solo, tornando as plantas menos susceptíveis ao déficit hídrico e a escassez de nutrientes (SPAEPEN et al. 2007).

O ácido indolacético pertence ao grupo das auxinas, tendo como precursor de sua biossíntese, o triptofano, que se encontra presente nos tecidos vegetais, estimulando a multiplicação celular e promovendo o crescimento vegetal (TIEN et al., 1979). Este fitohormônio produzido pelas bactérias, quando se encontra em concentrações baixas, atua estimulando o crescimento, e o mesmo em concentrações altas, prejudica o desenvolvimento radicular (SILVEIRA, 2008).

Trabalhos com isolados de *Streptomyces* spp. inoculados no substrato Plantmax para produção de mudas de bananeira demonstraram incrementos significativos, com valores de até 46,13% para altura das plantas, 65,51% para diâmetro do pseudocaule, 283,59% para a massa seca da parte aérea e 242,5% para matéria seca das raízes (PAIXÃO et al. 2008). Outros autores também relataram a promoção de crescimento por actinobactérias em outras culturas (LIMA, 2003; IGARASHI et al., 2003; BRITO, 2010).

4.0 CONCLUSÕES

1. A maioria dos isolados das actinobactérias apresentou a capacidade de colonização radicular *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira, 'Grande Naine' e 'Maravilha'.
2. As actinobactérias tem a capacidade de multiplicar no substrato orgânico de produção de mudas.
3. O efeito na promoção de crescimento foi observado na altura, massa fresca da parte aérea, massa fresca e seca da raiz nas mudas micropropagadas de bananeira, por algumas actinobactérias analisadas, com variações entre as cultivares 'Maravilha' e 'Grande Naine'.
4. Os isolados mais promissores para cultivar 'Maravilha' foram: AC 22, AC 34, AC 42 e AC 45.
5. Os isolados mais promissores para cultivar ' Grande Naine' foram: AC 26C, AC 26L, AC 30, AC 50, AC 52, AC 103 e AC 147.
6. O potencial de promoção de crescimento das actinobactérias depende do isolado de actinobactéria e da variedade de bananeira.

5.0 REFERÊNCIAS

ARDUIM, G da S. **Utilização e caracterização biológica de rizobacterias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Pelotas, 2006.

BARBIERI, P., ZANELLI, T., GALLI, E. & ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, p. 87-90, 1986.

BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E.M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium* wilt. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1-10, 2000.

BORGES, A.L.: SILVA, S. de O.Extração de macronutrientes por cultivares de banana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.17, n.1, p. 57-66,1995.

BORGES, A.LRAIJ, B. VAN; MAGALHÃES, A.F de ; bernardini. A.C. de. **Nutrição e adubação da bananeira irrigada**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. 8p. (EMBRAPA-CNPMPF. Circular Técnica, 48)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Evolução do mercado mundial de frutas**. 86p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/ESTUDOS_PUBLICACOES/ESTUDO_MERCADO_FRUTAS<CAPITULO_3.PDF>. Acesso em: 15 abr. 2009.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in so assay for indolacetic acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 535-538, 1991.

BRITO, M.A.M. **Estreptomicetos promotores de crescimento de plantas de girassol *Helianthus annuus* L. e pinhão manso *Jatropha curcas* L.** . 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, ambientais e Biológicas, Universidade Federal do recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

- CARRER, R.F.; ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides termo lilacinus*. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.6, p.457-460, 2008.
- CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 63, p.1670-1680, 1999.
- CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. **Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)**. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 213-234, 2000.
- COSTA, D.C. **Doenças causadas por nematóides**. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 66-77, 2000.
- COSTA, D. da C. **Nematoses em banana e abacaxi no Brasil: danos e manejo**. XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Uberlândia, v.22, p. 50-58, 2000.
- CRAWFORD, D.L. et. Al. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. Oxford, v.59, n.11, p. 3899, 1993.
- DECLERCK, S.; DEVOS, B.; DELVAUX, B.; PLENCHETTE, C. Growth response of micropropagated banana plants to VAM inoculation. **Fruits**, Paris, v.49, n.2, p.103-109, mar./abr.1994.
- DECLERCK, S.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v.176, p.183-187, 1995.
- DING, C.H.; JIANG, Z.Q.; LI, X.T.; LI, L.T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.20, n. 1, p.7-10, 2004
- FAO. **Yearbook Production**. Rome: FAO, 2004. v.48, p.164 - 165 (Statistics Series).
- FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Acessado em 20/07/2010. Disponível em: www.faostat.fao.org/site/340/default.aspx
- FAO-FAOSTAT **Database Results**, <http://apps.fao.org>. Acesso em 02 jan.2011.

FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T. & DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 61-70, 2003.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. 2000a, São Carlos, Programa e resumos... São Carlos: UFSCar, p. 255-258. 2000.

GAVA, C. A.T. **Seleção de streptomicetos para controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora***. 1998. 114 f. (Dissertação em Ciências do Solo), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

GOMES, R.C; SEMEDO, L.T.A.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LINHARES, L.F.; COELHO, R.R.R. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potencial in biocontrol. **Applied Microbiology**, v.30, p. 146-450, 2000.

GOODAY, G.H., ZHU, W.Y., DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus. FEMS: **Microbiology Letters**, v.100, p.387-392. 1992.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v.26, p.192-195, 1951.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HSU, S.U.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **American Society for Microbiology**, v. 29, p. 422-426, 1975.

IGARASHI, Y. et al. Secondary metabolites of endophytic actinomycetes with plant growth promoting activity. In; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF ACTINOMYCETES, 13., 2003. **Abstracts...** p.20, 2003.

INBAR, E.; GREEN, S.J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. **Microbial Ecology**. v. 50, 73-81, 2005.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, p. 79-85, 1959.

KIM, B. J.; KIM, C.J.; CHUN, J.; KOH, Y. H.; LEE, S. H.; HYUN, J. W.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.593-598, 2004.

LEWIS, K.J. **Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler**. Sheffield: University of Sheffield, 1988. 125p. PhD Thesis.

LIMA, J.L. **Seleção de actinobactérias para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

Li, J.; Jiang, Z.Q.; Xu, L.P.; Sun, F.F.; Guo, J.H. Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. **Biocontrol**. v.53, p.931-944, 2008.

LIN, M.L.; FOX, R.L. External and internal P requirements of mycorrhizal and non-mycorrhizal banana plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.10, n.9-16, p.1341-1348, 1987.

MALAVOLTA, E. 2006. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Ceres, 538 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 1995. 2. ed. London: Academic Press. 889 p.

MONTEIRO, E.M.S; MATOS, R.M.B; PAULA, M.A. de; GUERRA, J.G.M. Micorrizas vesículo-arbusculares em bananeiras: Aclimação e transplante de mudas micropropagadas. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4. 1991, Mendes, **Programa e Resumos...**, Itaguaí: EMBRAPA-CNPBS; UFRRJ, 1991, p. 163.

MURASHIMA, K.A.; KOSUGI, Y.R.H.; DOI, R.H. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.5088-5095, 2002.

NEVES, J.C.L.; GOMES, J. M. & NOVAIS, R.F. **Fertilização mineral de mudas de eucalipto**. In: BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F. (eds.) *Relação solo-eucalipto*. Viçosa. Folha de Viçosa, 1999, p. 99-126.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

PARK, J.O. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 05, p. 361-365, 2002.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S., Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40 p.524-532, 1991.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, New York, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; ALMEIDA, G.M.C.O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematóide cavernícola da bananeira *Radopholus similis***. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, London, England, v.71, p.981–990, 2006.

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.269-273, 2003.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**, v.8, p.174-178, 1960.

RADWAN, S.S.; DASHTI, N.; EL-NEMR, I.M. Enhancing the growth of *Vicia faba* plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert areas. **International Journal of Phytoremediation**, v.7, n.1, p.19-32, 2005.

RAMIREZ, P.; COHA, J.M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización e determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n.1 p.67-77, 2003.

ROCHA, S.F. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitism por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** Universidade Federal de Lavras. Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia (Tese), Lavras, MG, 2007.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de planas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**, Recife, UFRPE, 2001.

SHAHIDI BONJAR, B. G. H. et al. Broadspectrim: a novel antibacterial from *Streptomyces* sp. **Biotechnology**, Oman, v. 3, n. 2, p. 126-130, 2004;

SILVEIRA, A.B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, 2008, 113f. Tese (Doutorado em Ciência). Programa de Pós-Graduação Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de planas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**, Recife, UFRPE, 2001.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEP, 1998, 238p.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O.; ALMEIDA, N.S. Soil *Streptomyces* with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 04, p. 456-461, 2006.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M. da S.; ALMEIDA, G.M. Actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O. Production of *Streptomyces* inoculum in sterilized rice. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.64, n.6, p.641-644, Nov./Dec. 2007.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical.**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 447-453, out./dez. 2010.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.4, p.425-448, 2007.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; WINDING, A. Succession of indigenous *Pseudomonas spp.* and actinomycetes on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens* DR 54 and the fungicide imazolil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.3, p. 1147-1153, 2001.

TUITE, J. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess 1969. 239 p.

VICENTINI, S., SILVA, C.R.R., CARVALHO, J.G. & MENEGUCCI, J.L.P. Efeitos do MAP durante o enviveiramento de mudas de bananeiras cv. Grande Naine propagadas “in vitro”. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, p. 13-18, 1996.

CAPÍTULO 2

**Multiplicação de *Radopholus similis* em discos de cenoura e
biocontrole *In vitro* por actinobactérias**

RESUMO

Estevam, J. L. D. Multiplicação *in vitro* de *Radopholus similis* em discos de cenoura e biocontrole *in vitro* de *R. similis* por actinobactérias.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de metabólitos secundários produzidos por 21 isolados de actinobactérias na imobilidade e mortalidade de fêmeas de *Radopholus similis*, visando à seleção de actinobactérias com potencial para o biocontrole desse fitonematóide. Os nematóides foram multiplicados *in vitro*, em cilindros de cenouras desinfestados. Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf, sendo adicionados em cada tubo, 50 µL de uma suspensão contendo 25 fêmeas de *R. similis* e 500 µL dos metabólitos produzidos pelas actinobactérias no meio de cultura líquido. A mobilidade dos nematóides foi avaliada após a incubação por 24 e 48 horas nos metabólitos em meio de cultura. Após transferência dos nematóides para água estéril e incubação por 24 horas, foi determinado o percentual de mortalidade das fêmeas. Os metabólitos produzidos em meio de cultura líquido por diversas actinobactérias reduziram a mobilidade de *R. similis*, quando comparados à testemunha (nematóides incubados em água). Os metabólitos produzidos em meio líquido pelos isolados codificados como AC 02, AC 12, AC 16, AC 22, AC 26C, AC 26L, AC 28, AC 34, AC 39, AC 42 e AC 49, AC 92, AC 103 e AC 147 causaram taxas de mortalidade acima de 50%. Os isolados mais eficientes foram AC 92, AC 103, AC 39, AC 26C, AC 147, AC 12 e AC 34 que causaram 87,0%, 76,0%, 76,0%, 74,0%, 72,0%, 71,0% e 66,0% respectivamente, de mortalidade do *R. similis*.

Palavras-chave: *Streptomyces* sp., controle biológico, metabólitos secundários

ABSTRACT

Estevam, J. L. D. In vitro multiplication of *Radopholus similis* in carrot cylinders and in vitro biocontrol of *R. similis* by actinobacterias.

This study aimed to evaluate the effect of secondary metabolites produced by 21 isolates of actinobacteria in the immobility and mortality of *Radopholus similis* females, for selection of actinobacteria with potential for biocontrol of this plant parasitic nematode. The nematodes were multiplied *in vitro*, in surface sterilized carrot cylinders. A bioassay was conducted in Eppendorf tubes with a 50 μ L water suspension containing 25 females of *R.similis* and 500 μ L of actinobacteria liquid growth medium with the metabolites produced by them during growth. Nematode mobility was evaluated after incubation for 24 and 48 hours in culture medium with actinobacteria metabolites and, after transferring the nematodes to sterile water and incubation 24 hours, the percentage of females mortality was determined. Metabolites produced in liquid medium by several isolates of actinobacteria caused immobility of *R. similis*, when compared to control treatment (nematodes incubated in water). Isolates coded as AC 02, AC 12, AC 16, AC 22, AC 26C, 26L AC, AC 28, AC 34, AC 39, AC 42, AC 49, AC 92, AC 103, and AC 147 caused mortality rates above 50%. The most efficient isolates were AC 92, AC 103, AC 39, 26C AC, AC 147, AC 12, and AC 34, which caused 87.0%, 76.0%. 76.0% 74.0% 72.0% 71.0%, and 66.0% respectively, mortality rates of *R. similis*.

Keywords: *Radopholus similis*, biological control, secondary metabolites.

1.0 INTRODUÇÃO

Com uma produção de 6,78 milhões de toneladas, atualmente o Brasil destaca-se como terceiro produtor mundial de bananas, sendo cultivadas em quase todos os Estados brasileiros (FAO 2009). A bananicultura é uma atividade de alta relevância socioeconômica para o País. Todavia, apesar de ser um dos maiores produtores mundiais, o Brasil apresenta baixa produtividade média, quando comparado com outros países, cenário que vem sendo atribuído ao ataque de fitopatógenos e condições de plantio (COSTA, 2000).

Os fitonematóides estão entre os principais problemas fitossanitários da bananicultura brasileira. As perdas causadas por tais parasitas podem chegar a 100%, quando o seu controle não é efetuado corretamente. Danos nas raízes e nos rizomas, causados pela invasão de nematóides seguidos por certos fungos e bactérias, são os mais sérios problemas nas variedades do subgrupo Cavendish depois da Sigatoka-negra (COSTA, 2000). Estes nematóides comprometem a absorção e transporte de água e nutrientes pelo sistema radicular, provocam o tombamento de plantas e as predispõem ao ataque de outros microrganismos (DIAS & RIBEIRO JUNIOR, 2001).

Em levantamento realizado no Norte de Minas Gerais, DIAS & RIBEIRO JUNIOR (2001) detectaram as espécies *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden, *Pratylenchus coffear* (Zimmermann) Filipjev & Stekhoven, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira e *Meloidogyne spp.* Goeldi, as quais são citadas na literatura como as principais espécies de nematoides patogênicos à bananeira.

O nematóide *R. similis* em populações elevadas pode causar baixa produtividade, frutos de tamanho reduzido e tombamento da planta (COSTA, 2000). As lesões ocasionadas por este nematóide também podem ser portas de entrada para microrganismos fitopatogênicos (GOMES & CAMPOS, 2008).

Para redução da população de fitonematóides existem vários métodos de controle, sendo que o mais empregado é o químico, utilizando principalmente

nematicidas organofosforados e carbamatos. No entanto, este método apresenta custo alto e uma série de desvantagens com relação à contaminação do meio ambiente e a saúde humana.

As diferentes formulações dos nematicidas atuam de maneira diferente sobre o controle das espécies de nematóides presentes no solo. Os nematicidas atuam com maior eficácia sobre nematóides endoparasitas sedentários, como *Meloidogyne* spp, que possuem uma longa fase no solo, quando comparada à eficácia sobre endoparasitas migratórios como *R. similis*, o qual vive e completa seu ciclo de vida em raízes de banana (ARAYA & LAKHI, 2004). Sendo assim, sua utilização dificilmente alcançará um controle eficiente sobre todas as espécies. À medida que determinada formulação de nematicida controla uma determinada espécie de nematóide, outras espécies encontradas em nível populacional baixo poderão se reproduzir rapidamente passando a causar prejuízos à cultura, efeito que até então não era evidenciado devido à competição entre as diferentes espécies de nematóides (ARAYA & LAKHI, 2004).

Aplicações consecutivas dos nematicidas na superfície do solo causam um decréscimo no controle de nematóides e, depois de um curto período de tempo, ocorre a retomada da reprodução desses fitoparasitos. A população de *R. similis* voltou a crescer após aplicações sucessivas de nematicidas aldicarb, fenamifos, izazophos, carbofuran e cadusafos (STANTON & PATTISON, 2000), o que pode representar um grande problema ao longo do tempo, já que essa situação pode favorecer a seleção de nematóides resistentes à nematicidas. A perda da eficiência dos nematicidas com o tempo é atribuída a aceleração natural da bio degradação dos nematicidas após o uso repetido das mesmas formulações (ARAYA & LAKHI, 2004).

No solo, os nematicidas são degradados lentamente por microrganismos, em compostos não nematotoxicos (JOHNSON, 1998).

O uso de variedades resistentes é uma maneira natural e altamente recomendável de controlar pragas e doenças. Contudo, no caso específico de nematóides, são poucas as variedades de banana resistentes disponíveis para os agricultores e, mesmo assim, a resistência geralmente é direcionada a umas poucas espécies de nematóides, consideradas mais importantes para determinadas culturas.

O uso de nematicidas sistêmicos é considerado a única ferramenta eficaz para redução de danos causados por *R. similis* (DOCHEZ et al., 2000; SIKORA et al., 2007). O controle químico apresenta vários inconvenientes, como o alto custo dos produtos, os resíduos nos frutos, intoxicação pela exposição aos produtos, contaminações de fontes de água, destruição da microflora do solo (VILAS BOAS et al. 2002) e, em longo prazo, podem favorecer a indução da resistência de nematoides aos nematicidas.

Na procura por métodos não químicos, pesquisas vêm sendo realizadas visando à utilização do controle biológico com o uso de inimigos naturais. O controle biológico surge como uma alternativa racional de melhor aproveitamento dos recursos naturais e se constitui numa demanda constante na agricultura atual, devido à conscientização da necessidade de utilização de tecnologias limpas de produção agrícola, ambientalmente mais aceitas e que contribuam para a preservação dos recursos naturais e a sustentabilidade dos agroecossistemas (COIMBRA & CAMPOS, 2005).

Dentre os microrganismos com potencial para o controle biológico, destacam-se as actinobactérias, que são bactérias Gram-positivas, aeróbicas estritas, comumente encontradas no solo, porém ocorrendo também em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição (OTINIANO et al., 2006). As actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* são mundialmente conhecidas pela produção de antibióticos (PADILHA, 1998), agindo no controle de diversas doenças de plantas (EL-ABYD et al., 1993; SILVA, 1998).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de actinobactérias na mortalidade *in vitro* de fêmeas e juvenis de *R. similis*.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Obtenção de metabólitos dos actinobactérias

Foram avaliados 21 isolados de actinobactérias provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, codificados como AC 02, AC 12, AC 16, AC 19, AC 21, AC 22, AC 26C, AC 26L, AC 28, AC 30, AC 34, AC 39, AC 42, AC 45, AC 46, AC 49, AC 50, AC 52, AC 92, AC 103 e AC 147. Estes isolados foram pré-selecionados em trabalhos anteriores como promissores para biocontrole e promoção de crescimento do tomateiro, bananeira, girassol, pinhão manso e mamoneira (SOUZA et al., 2006; PAIXÃO, 2008; BRITO, 2010). Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido arginina glicerol sais minerais (AGS) (POTER et al. , 1960), com incubação em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Após este período, 10 discos de 6 mm das culturas foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo meio de cultura AGS líquido, sendo estes incubados por 14 dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, em agitador orbital, a 140 rpm. Ao final desse período, as culturas de actinobactérias foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos para separar as células de actinobactérias do sobrenadante (meio líquido contendo os metabólitos produzidos pelas actinobactérias). O sobrenadante foi armazenado em tubos de centrífuga em polietileno, esterilizados, com capacidade para 15 mL, com tampa de rosca e mantidos em freezer a -4°C , para testes futuros.

2.2) Multiplicação de *Radopholus similis* em discos de cenoura.

A cultura de *R. similis* foi obtida da coleção de culturas em cilindro de cenouras *in vitro*, cedida pelo Dr. Dilson Costa da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. Posteriormente, os nematóides foram multiplicados em disco de cenoura no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sendo realizados vários

experimentos para ajuste da metodologia já descrita anteriormente, buscando evitar a contaminação e, conseqüentemente, a perda de nematóides.

Cenouras frescas, oriundas de plantio orgânico, foram colhidas e transportadas diretamente para o laboratório, onde foram lavadas com água corrente e detergente líquido neutro durante 2 minutos. Para desinfestação, em câmara de fluxo laminar, as cenouras foram borrifadas com álcool a 95% e flambadas por três vezes consecutivas, por toda a superfície. A casca da cenoura foi removida com auxílio de um bisturi flambado. Em seguida foram realizados cortes transversais sobre papel toalha esterilizado, para a obtenção de discos de 3 a 5 mm de espessura. Ainda com auxílio do bisturi foram realizadas três pequenas e leves perfurações nos discos de cenoura para posterior inoculação do nematóide. Em seguida, os discos foram transferidos para placas de Petri (um disco/placa), sendo estas seladas com filme de plástico PVC (Figura 1).



Figura 1. Metodologia de preparo dos discos de cenoura para multiplicação de *R.similis*. **(A)** cortes dos discos de cenoura com bisturi; **(B)** padrão estabelecido de perfurações dos discos de cenoura para posterior inoculação dos nematóides; **(C)** discos em placas seladas com filme de plástico PVC.

2.3) Obtenção e desinfestação de *Radopholus similis*:

Devido a problemas de contaminação por bactérias e fungos nos discos de cenoura com a cultura de *R. similis*, os nematóides foram extraídos dos discos de cenoura e inoculados em mudas micropropagadas de bananeira, cultivadas em vasos plásticos de polietileno de 5 L contendo substrato Vivato Slim, sendo mantidas em casa de vegetação por 50 dias. Após este período, as raízes foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 30 segundos. Em

seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 500 mesh. Com o auxílio da pisseta com água destilada, o material retido na peneira inferior foi transferido para um Becker com capacidade para 100 mL e, em seguida, a suspensão obtida (40 mL) foi vertida para tubos de centrifuga, acrescentando-se 1g de caolim e centrifugada a 1750 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e cada tubo contendo o pellet, foi preenchido com a solução aquosa de sacarose a 50%, retornando os tubos para centrifugação a 1750 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh mantendo-a inclinada e com o auxílio de uma pisseta contendo água, eliminou-se o excesso de sacarose e recolheu-se a suspensão em um Becker com capacidade para 100 mL. Desta suspensão de nematóides, removeu-se 1mL para observação em microscópio. Os nematóides encontrados com vida foram pescados e transferidos para Eppendorf (POCASANGRE, 2000; MENESES, 2003; NÚÑEZ, 2006).

A desinfestação dos nematóides foi feita colocando 25 fêmeas de *R.similis* por tubo de Eppendorf, sendo o volume deste completado com água destilada esterilizada para 1 mL e estes centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. Em seguida, retirou-se o excesso de água com auxílio de uma pipeta com ponteiros esterilizados, deixando-se um pouco de água no fundo dos tubos e, com o auxílio de um microscópico estereoscópico, observou-se a presença de nematóides.

Posteriormente, o volume dos tubos de Eppendorf foi completado com solução de cloreto de mercúrio (0,01%) para 1,5 mL e novamente centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. Retirou-se o excesso da solução de cloreto com a micropipeta, verificando-se a presença de nematóides, sendo o volume completado com solução de sulfato de estreptomicina (0,02%), seguida de centrifugação conforme descrito anteriormente. Após retirar o excesso de estreptomicina e verificar a presença de nematóides, o volume dos tubos de Eppendorf foram completados com água destilada esterilizada para 1 mL, sendo estes centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. Em seguida, verificou-se a presença de nematoides, em microscópio estereoscópico, e repetiu-se a centrifugação com água destilada esterilizada.

2.4) Inoculação de *R. similis* em discos de cenoura

Na câmara de fluxo laminar e com auxílio de uma micropipeta, após o processo de desinfestação dos nematoides descrito acima, o volume restante nos tubos de Eppendorf foi coletado e transferido para os discos de cenoura, sendo colocados cerca de 100 nematóides em cada orifício dos discos. Após inoculação, as placas contendo os discos de cenoura inoculados foram mantidas em repouso por 24 horas a temperatura ambiente, e no dia seguinte foram incubadas em BOD a 28°C por 28 dias. Os nematóides foram extraídos dos discos de cenoura seguindo a metodologia descrita por Nunes (2006).

2.5) Avaliação dos metabólitos das actinobactérias na imobilidade e mortalidade de fêmeas de *R. similis*.

Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf esterilizados, com os 21 isolados de actinobactérias, selecionados anteriormente. Foram colocados 50 µL de uma suspensão contendo 25 fêmeas de *R. similis* e 500 µL de meio de cultura AGS líquido contendo os metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias, conforme descrito no item 2.1. Os tubos foram incubados a 28°C em câmara de crescimento B.O.D.

Após 24 e 48 horas de incubação foram contados os nematoides móveis e imóveis, com auxílio do microscópio óptico. Em seguida, os nematoides foram retirados da suspensão de metabólitos e transferidos para água esterilizada, onde permaneceram por mais 24 horas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram considerados mortos os nematóides que depois desse período em água, não recuperaram a mobilidade, sendo avaliada a porcentagem de fêmeas imobilizados e mortas. O tratamento testemunha foi formado por fêmeas de *R. similis* incubadas em água destilada esterilizada e também incubadas em meio líquido AGS sem cultivo de actinobactérias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram transformados em $\arcsin(x/100)^{0,5}$, submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

2.6) Produção de quitinase e lipase pelas actinobactérias

A atividade quitinolítica foi determinada conforme metodologia descrita por REWICK et al., (1991). As actinobactérias foram multiplicadas em meio mínimo de sais minerais ágar (TUIITE, 1969), suplementado com quitina coloidal como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas em câmara B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por dez dias. Após este período, detectou-se a atividade quitinolítica dos isolados por meio da visualização de um halo hialino em torno das colônias crescidas.

Para avaliação da produção de lipase, os isolados de actinobactérias foram multiplicados no meio de cultura de SIERRA (1957), contendo Tween 80 como única fonte de carbono, em câmara de crescimento tipo B.O.D., a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por dez dias. A produção da enzima foi detectada pela formação de um halo branco difuso, constituído de minúsculos precipitados de oleato de cálcio, ao redor das colônias crescidas dos microrganismos.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1) Multiplicação de *R.similis* em discos de cenouras

A metodologia utilizada para desinfestação de *R. similis* foi eficiente, uma vez que, no total de 90 placas com discos de cenoura (um disco/placa), foi observado um baixo percentual (5%) de contaminação. A taxa de multiplicação de *R. similis* foi superior nos discos de cenoura com aproximadamente 5 mm de espessura, em relação aos discos de 3 mm de espessura (Figura 2).

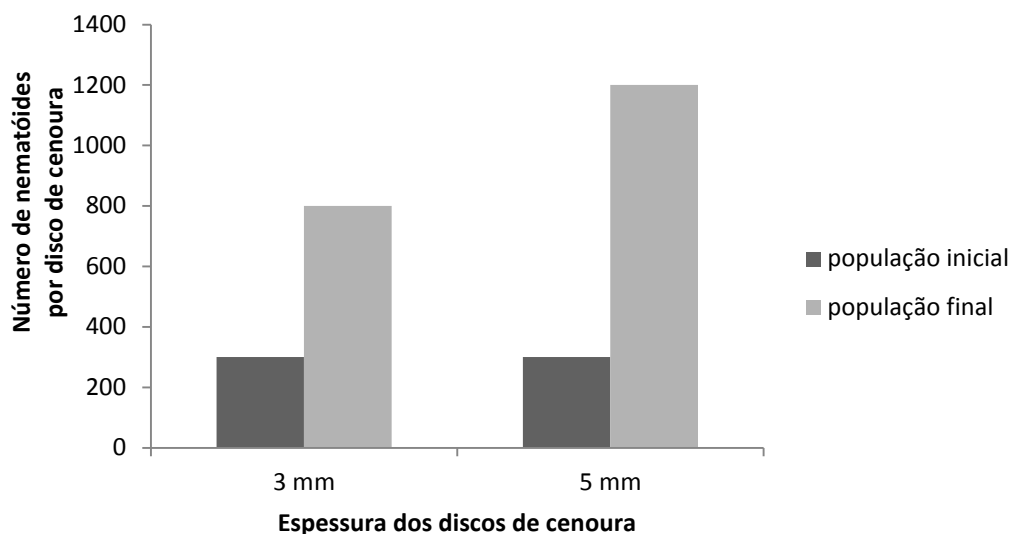


Figura 2. População de *R. similis*, após 28 dias de inoculação e incubação em discos de cenoura medindo 3 mm e 5 mm de espessura. O tratamento testemunha foi formado por discos de cenoura de 3 e 5 mm de espessura sem inoculação com nematoide.

3.2) Caracterização fisiológica dos actinobactérias.

Dentre as actinobactérias testadas, nove apresentaram atividade quitinolítica (42% dos isolados) e, à exceção dos isolados AC 02, AC 12 e AC 30, os demais (95% dos isolados) demonstraram ser produtores de lipase (Tabela 1).

A produção de quitinase pelos isolados de actinobactérias é um mecanismo utilizado no biocontrole de nematóides, pela destruição da cutícula do nematóide (GOODAY et al., 1992; PARK et al., 2002). As lipases são importantes no controle de nematóides por degradarem as reservas energéticas dos nematóides e por atuar nos lipídios de membrana (ARDUIM, 2006; ROCHA, 2007).

A quitina é um polissacarídeo presente na parede celular da maioria dos fungos fitopatogênicos, portanto a produção dessa enzima por parte dos isolados das actinobactérias selecionados pode vir a ser um importante mecanismo de biocontrole (GOODAY et al., 1992; GOMES et al., 2000).

Tabela 1. Produção de enzimas extracelulares por actinobactérias.

Isolado de Actinobactérias*	Atividade enzimática	
	Quitinase	Lipase
AC 02	-	-
AC 12	+	-
AC 16	+	+
AC 19	-	+
AC 21	-	+
AC 22	-	+
AC 26C	+	+
AC 26L	-	+
AC 28	-	+
AC 30	+	-
AC 34	+	+
AC 39	+	+
AC 42	-	+
AC 45	-	+
AC 46	-	+
AC 49	-	+
AC 50	-	+
AC 52	-	+
AC 92	+	+
AC 103	+	+
AC 147	+	+

*Os isolados foram cultivados em meio mínimo de sais com os respectivos substratos para as enzimas e a atividade foi verificada por meio da presença de zonas de hidrólise em torno das colônias, para a produção das enzimas quitinase e lipase. O sinal positivo indica produção e o negativo a não produção das enzimas extracelulares.

3.3) Avaliação dos metabólitos das actinobactérias na mortalidade de fêmeas de *R. similis*.

Os metabólitos produzidos em meio líquido pelos isolados de actinobactérias apresentaram efeito nematostático e nematicida para *R. similis* ($P \leq 0,05$), quando comparados às testemunhas com água ou meio líquido AGS sem o crescimento de actinobactérias (Tabela 2). Para a maioria dos isolados testados, a percentagem de imobilidade de *R. similis* foi acima de 50%, após 24 e 48 horas de incubação no meio contendo os metabólitos secundários, quando comparados às testemunhas, caracterizando-se como efeito nematostático desses metabólitos (Tabela 2).

Observou-se que 16 isolados de actinobactérias causaram mortalidade das fêmeas acima de 50%, após incubação no meio líquido com os metabólitos seguido do período de 24 horas em água esterilizada, indicando um efeito nematicida. Os isolados de actinobactérias que causaram as maiores percentagens na mortalidade foram: AC 92, AC 103, AC 39, AC 26C, AC 147, AC 12 e AC 34, com 87,0%, 76,0%, 76,0%, 74,0%, 72,0%, 71,0% e 66,0%, respectivamente, de mortalidade de *R. similis* (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de metabólitos de actinobactérias na mobilidade e mortalidade de fêmeas de *R. similis* após 24, 48 e 72 horas de exposição.

Isolados de actinobactérias	Fêmeas de <i>R. similis</i>		
	Imóveis (%)*		Mortos (%)*
	24 h	48 h	72 h
Testemunha (Água)	0,00 f*	0,00 e	8,00 d
Testemunha (AGS)	15,00 e	14,00 d	14,00 d
AC 02	53,00c	59,00 b	58,00 b
AC 12	78,00a	78,00 a	71,00 a
AC 16	39,00 d	58,00 b	56,00 b
AC 19	34,00 d	38,00 c	36,00 c
AC 21	36,00 d	42,00 c	47,00 b
AC 22	47,00 c	53,00 b	51,00 b
AC 26C	71,00 b	81,00 a	74,00 a
AC 26L	54,00 c	62,00 b	58,00 b
AC 28	44,00 d	51,00 b	53,00 b
AC 30	55,00 c	63,00 b	48,00 b
AC 34	57,00 c	58,00 b	66,00 a
AC 39	76,00 a	76,00 a	76,00 a
AC 42	42,00 c	55,00 b	59,00 b
AC 45	23,00 e	27,00 c	27,00 c
AC 46	38,00 d	38,00 c	38,00 c
AC 49	52,00 c	52,00 b	51,00 b
AC50	64,00 b	64,00 b	50,00 b
AC 52	60,00 c	64,00 b	48,00 b
AC 92	87,00 a	89,00 a	87,00 a
AC 103	67,25 b	74,00 a	76,00 a
AC 147	69,00 b	69,00 a	72,00 a

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Substâncias produzidas *in vitro* por fungos e bactérias têm sido reportadas inibindo a eclosão, afetando a motilidade e causando mortalidade em fitonematóides (COSTA, 2001). NAVES et al., (2004), observaram que a imobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* aumentaram em todos os filtrados bacterianos testados, quando se aumentou o período de exposição de 24 para 48 horas. COIMBRA & CAMPOS (2005), ao avaliar o efeito de exsudatos de actinobactérias na motilidade e mortalidade de juvenis de *M. javanica*, observaram que os isolados testados promoveram efeito nematocida, com valores de mortalidade entre 19 e 100%. SOUSA et al., (2009) avaliaram o efeito de estreptomicetos no controle do nematóide *Scutellonema bradys* em túberas de inhame e verificaram que metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias promoveram até 100% de mortalidade. Becker et al., (1988), observaram que houve inibição parcial ou total do movimento de *M. incognita* causada por 50 rizobactérias em testes *in vitro*. PAIXÃO et al, (2008) avaliaram o efeito de actinobactérias no controle *in vitro* de *R. similis* e verificaram que dos isolados testados, três se destacaram promovendo até 100% de mortalidade.

No presente trabalho, observou-se que os efeitos nematostático e nematocida dos metabólitos secundários variam com o isolado de actinobactérias. De fato, diferenças intrínsecas entre as espécies de actinobactérias, além das características do meio de crescimento, como o pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, podem interferir tanto na quantidade quanto na composição dos metabólitos produzidos (MOURA et al., 1998), alterando o efeito nematostático e nematocida proporcionado pelo meio de cultura líquido contendo os metabólitos produzidos pelas actinobactérias. Assim, sugere-se que diferentes meios de cultura e condições de pH, temperatura e período de incubação para o crescimento das actinobactérias devem ser estudados para a seleção de isolados promissores de actinobactérias com efeito nematostático e nematocida. Adicionalmente, a seleção de isolados promissores exige o estudo com plantas em condições de casa de vegetação e campo.

4.0 CONCLUSÕES

1. Os extratos contendo os metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias apresentaram efeito nematostático e nematicida nos testes *in vitro*;
2. Dentre as actinobactérias testadas, os isolados AC 12, AC 26C, AC 39, AC 92, AC 103 e AC 147 são os mais promissores para o biocontrole de *R. similis*.
3. Os isolados mais promissores são produtores de quitinase. Alguns isolados foram capazes de produzir lipases.
4. A taxa de multiplicação de *R. similis* em discos de cenoura é mais elevada em discos com 5mm de espessura, do que em discos de 3mm.

REFERÊNCIAS

ARAYA, M. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Equador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 79-102. 2003

ARDUIM, G. da S. **Utilização e caracterização biológica de rizobacterias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Pelotas, 2006.

BRITO, M.A.M. **Estreptomicetos promotores de crescimento de plantas de girassol *Helianthus annuus* L. e pinhão manso *Jatropha curcas* L.** . 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, ambientais e Biológicas, Universidade Federal do recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.J.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; PINTO, Z.V. Supressividade de fitopatógenos habitantes do solo. In: Bettiol, W., Morandi, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 187-208, 2009.

COSTA, D.C. **Doenças causadas por nematóides.** In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília:Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p. 66-77. 2000.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinobactérias na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 232-238, 2005.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito antagônico de actinobactérias isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n.2, p.32, 2010.

DIAS, M.S.C.; RIBEIRO JUNIOR, P.M. **Nematóides na bananicultura** In: Simpósio Norte Mineiro sobre a Cultura da Banana. Anais... Montes Claros: Ed. Unimontes, p. 168-179, 2001.

GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, JB; FERNÁNDEZ GONZALVES, E. **Manejo alternativo de nematodos en musáceas**. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Ecuador . INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 119-120, 2003.

GOMES, C. B.; CAMPOS, A. D. Doenças causadas por nematoides na cultura do pessegueiro: sistema de produção, 2007. Disponível em: <http://sistemadeprodução.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/Pessego/PessegodemesaRegiãoSerraGaucha/nemato.htm>. Acesso em: 22 de novembro 2010.

MENESES HERNÁNDEZ, A. 2003. **Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus (Cobb)* Thorne**. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 67 p.

MOURA, A. B. **Actinobactérias como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro**. 1996, 64f., Tese de (Doutorado em Fitopatologia), Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 1996.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Filtrados de Culturas Bacterianas Endofíticas na Motilidade, Mortalidade e Eclosão de Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p. 384-387, 2004.

NÚÑEZ PÉREZ, C.T. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p. 2006.

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematóide cavernícula da bananeira *Radopholus similis***. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

POCASANGRE, L. **Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense)**. Tesis Ph.D. Universidad de Bonn. 95 p, 2000.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F.S. Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 486-491, 2009.

VILAS BOAS, L.C.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S.P.; ROCHA, H.S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incógnita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n. 3, p. 690-693, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da bananeira é de grande importância econômica, social e nutricional para o Brasil. Entretanto, problemas fitossanitários, principalmente os causados pelo nematoide *R. similis*, têm sido uma grande ameaça a bananicultura, pelos danos causados e pelas dificuldades no controle com nematicidas. A busca por alternativas de produção sustentáveis tem intensificado os estudos com actinobactérias visando a promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos.

No presente trabalho, foram observados incrementos significativos no crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, variedades 'Maravilha' e 'Grande Naine', cultivadas em substrato Vivatto Slim® inoculado e incubado com actinobactérias. A incubação proporciona o tempo necessário para o crescimento das actinobactérias no substrato e a ação destas na produção de metabólitos secundários e na decomposição dos compostos orgânicos, tornando um ambiente mais favorável ao crescimento das plantas, devido a maior disponibilidade de nutrientes e a ação de metabólitos secundários no crescimento vegetal e no controle de fitonematóides e outros fitopatógenos. Outros aspectos devem ser considerados na promoção de crescimento das plantas como a produção de substâncias reguladoras de crescimento e solubilização de fosfatos pelas actinobactérias. A ação das actinobactérias no meio de cultura líquido, com a produção de metabólitos secundários, estes não identificados, causou mortalidade significativa em *R. similis*. O controle de fitopatógenos constitui-se num mecanismo indireto de promoção de crescimento pelas actinobactérias. Entretanto, no presente trabalho, o efeito nematicida das actinobactérias não foi testado nas mudas de bananeira, devido à baixa quantidade de inoculo de *R. similis* obtido nos discos de cenoura.

As actinobactérias apresentam a capacidade de crescimento no substrato orgânico Vivatto Slim® e de colonização *in vitro* de raízes de mudas micropropagadas de bananeira.

Assim, outros estudos devem ser conduzidos para complementar o que foi iniciado neste trabalho, como o uso de actinobactérias no enriquecimento de substratos para crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, ainda com o potencial de controle de *R. similis*.

A produção de enzimas extracelulares e ácido indolacético *in vitro* pelos isolados de actinobactérias não fornece garantia que o mesmo ocorrerá *in vivo*. Neste trabalho, as atividades fisiológicas *in vitro* foram utilizadas apenas como indicadores de possíveis mecanismos de ação das actinobactérias.

Os isolados de actinobactérias avaliados quanto à colonização *in vitro* de raízes, mostraram-se promissores, colonizando as duas variedades de banana estudadas neste trabalho e promovendo incrementos significativos no crescimento das mudas micropropagadas de bananeira, em relação aos parâmetros; altura da planta, massa fresca da parte aérea, massa fresca e seca da raiz, com variações entre as cultivares 'Maravilha' e 'Grande Naine' (capítulo 1).

A multiplicação de *R. similis*, em discos de cenoura necessita de maiores estudos referente a espessura dos discos e metodologia de desinfestação (capítulo 2).

Pesquisas futuras são indispensáveis para testar os metabólitos produzidos pelas actinobactérias mais promissoras, em diferentes meios de cultura e incubação por diferentes períodos de tempo, bem como testar o biocontrole de nematóide em mudas de bananeira, em condições de casa de vegetação e de campo.

Outros aspectos importantes para estudos futuros são a identificação das actinobactérias em nível de gênero e espécie, e identificação das substâncias envolvidas na interação actinobactéria-planta-nematóide. A seleção de actinobactérias colonizadoras de raízes e agentes de biocontrole poderá contribuir para uma agricultura sustentável, visando aumentar a eficiência no controle dos nematoides e no crescimento e produtividade de culturas de importância econômica e social.