

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO SISTEMA
RADICULAR: ISOLAMENTO E POTENCIAL
PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITONEMATÓIDES.**

ROSEMEIRE DE LELLIS NAVES

2000

ROSEMEIRE DE LELLIS NAVES

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO SISTEMA
RADICULAR: ISOLAMENTO E POTENCIAL
PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITONEMATÓIDES.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Naves, Rosemeire de Lellis

Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides / Rosemeire de Lellis Naves. -- Lavras : UFLA, 2000.

113 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Bactéria endofítica. 2. Fitonematóide. 3. *Meloidogyne javanica*. 4. Controle biológico. 5. Filtrado bacteriano. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.95
-632.65182
-632.96

ROSEMEIRE DE LELLIS NAVES

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO SISTEMA
RADICULAR: ISOLAMENTO E POTENCIAL
PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITONEMATÓIDES.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de "Doutor".

APROVADA em 16 de março de 2000.

Prof. Ricardo Magela de Souza UFLA

Prof. José Rogério Oliveira UFV

Profª. Fátima Maria Souza Moreira UFLA

Profª. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira UFV

Prof. Paulo Estêvão de Souza UFLA



Prof. Vicente Paulo Campos

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**À minha filha Helena,
meu constante incentivo na caminhada.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

O caminho foi longo e difícil, mas durante o percurso tivemos o privilégio de poder contar com o apoio daqueles com quem convivemos. Portanto, mais uma vez é hora de dizer muito obrigada.

Gostaria de agradecer a Deus, que na sua infinita bondade, mais uma vez me deu a chance de lutar.

Minha eterna gratidão a minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos. A Helena, minha filha, por cada sorriso puro e inúmeros gestos de carinho sincero, muito obrigada.

Obrigada ao Prof. Vicente Paulo Campos pelo exemplo de profissionalismo, amor e dedicação à pesquisa e por todas as palavras de incentivo que sempre me fizeram prosseguir.

Obrigada ao Prof. Ricardo Magela de Souza pela co-orientação e principalmente pela amizade e compreensão demonstradas.

À Universidade Federal de Lavras, à Universidade de Alfenas pela oportunidade concedida para a realização do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, muito obrigada.

Aos professores Fátima Maria Souza Moreira, José Rogério Oliveira, Paulo Estêvão de Souza e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, obrigada pelas valiosas sugestões apresentadas.

Obrigada ao Prof. Daniel Furtado e a Maria Cristina Duarte Rios pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores Messias José de Bastos Andrade e Rovilson José de Souza do Departamento de Agricultura da UFLA e a Nelzi Aparecida Silva, obrigada pela compreensão e pela disposição em ajudar sempre.

Meus sinceros agradecimentos ao Tarley Luiz de Paula e a Ana Maria de Castro pelo auxílio nos trabalhos de laboratório e casa-de-vegetação. Ao colega Cleber Maximiniano, obrigada pela paciência e auxílio constantes.

Obrigada aos companheiros do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Dilourdes, Eloísa, Leisa, Marco Antônio, Carzinho, Ângela, Terezinha, Ivani, Marli, D. Cida e D. Zélia, pela constante colaboração e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Nematologia, Andrei, Cacilda, Fábio, João, Marcos Roberto, Mauro, Sônia, Anderson e Fernando, pelas sugestões e agradável convivência, muito obrigada.

Obrigada aos professores dos Departamentos de Agricultura e Fitopatologia da UFLA pelos ensinamentos e amizade.

Meu carinho aos companheiros de curso e amigos conquistados durante a caminhada.

E a todos aqueles que contribuíram com palavras de estímulo, muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1: Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides	i
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 Introdução Geral	1
2 Referencial Teórico	3
2.1 Ocorrência de bactéria endofíticas	5
2.2 Métodos de isolamento de bactérias endofíticas	8
2.3 Modos de penetração de bactérias endofíticas	14
2.4 Bactérias endofíticas no controle de fitopatógenos	17
2.5 Promoção de crescimento por bactérias endofíticas	19
2.6 Métodos de inoculação de bactérias endofíticas	21
2.7 Associação de nematóides com bactérias produtoras de substâncias tóxicas	23
2.8 Efeito de filtrados de culturas bacterianas sobre fitonematóides	24
2.9 Obtenção dos filtrados de culturas bacterianas	25
3 Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 2: Isolamento de bactérias endofíticas a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas	42
Resumo	42
Abstract	43
1 Introdução	44
2 Material e Métodos	46
3 Resultados e Discussão	49
4 Conclusões	57
5 Referências Bibliográficas	58
CAPÍTULO 3: Efeito de filtrados de isolados de bactérias endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	63
Resumo	63
Abstract	64
1 Introdução	65
2 Material e Métodos	67
3 Resultados e Discussão	71

4 Conclusões.....	81
5 Referências Bibliográficas.....	82
CAPÍTULO 4: Antagonismo de bactérias endofíticas à formação de galhas e reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro.....	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
1 Introdução.....	86
2 Material e Métodos.....	88
3 Resultados e Discussão.....	93
4 Conclusões.....	100
5 Referências Bibliográficas.....	101
ANEXOS.....	104

CAPÍTULO 1

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO SISTEMA RADICULAR: ISOLAMENTO E POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATÓIDES.

RESUMO

NAVES, Rosemeire de Lellis. **Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides.** Lavras: UFLA, 2000. 113p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia).*

Oitenta e um isolados de bactérias endofíticas foram obtidos a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas como braquiária (*Brachiaria* sp.), crotalária (*Crotalaria* sp.), milho (*Zea mays* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e trigo (*Triticum aestivum* L.), coletadas nos municípios de Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci e Alfenas. Ensaios *in vitro* e em casa-de-vegetação foram realizados com 40 isolados. Testaram-se os efeitos dos filtrados das culturas dos isolados na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. Sete isolados imobilizaram os juvenis em 24 horas, não ocorrendo recuperação da mobilidade após serem transferidos para água, provocando, dessa forma, porcentagens de mortalidade semelhantes à provocada pelo nematicida aldicarbe utilizado como controle. Os mesmos isolados também inibiram eficientemente a eclosão dos juvenis. Dois isolados provocaram a morte de mais de 90% dos juvenis somente após 48 horas de exposição. Diferentes concentrações dos filtrados dos isolados mais eficientes também foram testadas. Maiores índices de mortalidade e redução na eclosão foram provocados pelas diluições 1:0 e 1:1(v/v) (filtrado:água), sendo a eficiência das diluições diferenciada para cada isolado. Em casa-de-vegetação foi avaliado o antagonismo dos isolados à formação de galhas e reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Dois métodos de inoculação das bactérias foram testados: microbiolização das sementes e irrigação do substrato. Quinze dias após a semeadura, 400 ovos de *Meloidogyne javanica* em solução aquosa foram colocados ao redor de cada planta. Trinta dias após a infestação do substrato com o nematóide foram avaliados a altura de planta, peso da matéria seca da parte aérea, peso da matéria fresca do sistema

* Comitê de Orientação: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) – Ricardo Magela de Souza – UFLA.

radicular, os números de galhas e de ovos por grama de raiz. Todos os isolados testados diferiram da testemunha quanto ao número de galhas por grama de raiz, apresentando percentuais de redução que variaram entre 18,79% e 58,68%. Apenas três isolados não diferiram da testemunha quanto ao número de ovos por grama de raiz. Reduções significativas, entre 20,75% e 64,87%, no número de ovos por grama de raiz, foram observados para os demais isolados testados. Sete isolados bacterianos induziram as maiores reduções do número de galhas e de ovos por grama de raiz concomitantemente. Nenhum dos quarenta isolados testados mostrou efeito no crescimento das plantas, não havendo também diferença significativa entre as médias dos métodos de inoculação testados.

ABSTRACT

NAVES, Rosemeire de Lellis. Endophytic bacteria of the root system: isolation and potential for the biological control of plant parasitic nematodes. Lavras: UFLA, 2000. 113p. (Thesis - Doctorate in Crop Science).*

Eighty one isolates of endophytic bacteria were obtained from the root systems of different species of plants such as brachiaria (*Brachiaria* sp.), crotalaria (*Crotalaria* sp.), corn (*Zea mays* L.), sweet pepper (*Capsicum annum* L.), marigold (*Tagetes erecta* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and wheat (*Triticum aestivum* L.), collected from Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci and Alfenas towns in Minas Gerais state, Brazil. *In vitro* and greenhouse trials were accomplished with forty isolates. Isolates filtrates of endophytic bacteria on the motility, mortality and hatching of second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne javanica* were tested. For obtaining the filtrates, bacteria were cultivated in liquid tryptic soy broth (TSB) medium for seven days at 28°C under constant stirring at 100 rpm, centrifuged at 10,000 G for 15 minutes. The supernatant was filtrated in Millipore filter of 0,22 µm of pore opening. The evaluations were done 24 and 48 hours later by counting the numbers of non motile nematodes and dead. Hatched J₂ were counted 15 days after setting up the experiment. Seven bacterial isolates immobilized the juveniles with 24 hours of exposure, but the movement was not recovered when placed in water. This effect was similar to aldicarb treatment used as control. These isolates inhibited hatching, as well. Two isolates killed more than 90% of J₂ after 48 hours exposure. Dilutions of the filtrates were tested using the best isolates based on reduction of hatching, increased mortality and inhibition of motility. Dilutions of 1:0 and 1:1 (bacterial filtrate: water) greatly reduced hatch, increased mortality and inhibited movement of J₂. In greenhouse, the antagonism of the forty isolates to galls formation and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato was evaluated. Two inoculation methods of bacteria were tested: seed microbiolization and substrate irrigation. Fifteen days after sowing, 400 eggs in aqueous solution were placed around each plant. Thirty days after the substrate infestation with nematode, plant height, shoot dry matter weight, root system dry weight, number of galls and eggs per gram of root were evaluated. All isolates reduced the number of galls as compared to control. The reduction varied from

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos - UFLA (Orientador) - Ricardo Magela de Souza - UFLA.

18,79% to 58,68%. Only three bacterial isolates did not affect the nematode reproduction when compared to control. All others isolates induced significant reductions on number of eggs per gram of the root, varying from 20,75% to 64,87% compared to control. Simultaneous reduction on number of galls and number of eggs per gram of the root were induced by seven bacterial isolates only. No bacterium isolates promoted plant growth. Differences among inoculation methods were not observed.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os fitonematóides são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola, induzindo a migração de culturas das áreas produtoras ou impossibilitando o cultivo de algumas delas em regiões inteiramente infestadas (Campos, Sivapalam e Gnanapragasam, 1990). Mais de 2.200 espécies de nematóides parasitam plantas em todo o mundo (Siddiqi, 1986). Nematóides de alta agressividade atacam tanto as culturas de exportação como as de abastecimento interno no Brasil, causando cerca de 14% de queda na produção de alimentos (Lordello, 1984; Campos, 1997)

Muitos métodos de controle de nematóides têm sido estudados, sendo o emprego de cultivares resistentes ou tolerantes e o controle químico os mais utilizados. Contudo, vários fatores têm conduzido à busca de métodos alternativos para o controle de fitonematóides (Kerry, 1990), tais como: desequilíbrio ecológico causado pelo uso contínuo ou inadequado de nematicidas (Thomason, 1987), provocando até intoxicação ao homem e aumento do custo de produção; resistência específica aos fitopatógenos, antagonismos entre rusticidade e características agrícolas desejáveis como importantes entraves ao controle varietal (Novaretti, 1986).

Assim sendo, durante os últimos anos, o controle biológico vem recebendo bastante atenção, com intensas pesquisas, motivadas pela preservação do ambiente. Maior enfoque tem sido dado ao uso de matéria orgânica para estimular os microrganismos antagonistas do solo (Rodríguez-Kábana e Morgan-Jones, 1987) e ao uso de microrganismos predadores ou parasitas de nematóides (Mankau, 1981; Kerry, 1984; Jatala, 1986; Sayre e Starr, 1988). Embora níveis promissores de controle tenham sido alcançados com esses métodos, ainda não se conseguiu expansão do seu uso na agricultura. Desvantagens como a necessidade de aplicação de muitas toneladas de materiais

orgânicos por hectare e o decréscimo da população dos microrganismos predadores ou parasitas após sua introdução no solo pela perda da competição com microrganismos nativos (Kloepper et al., 1992), são alguns dos entraves do uso intensivo e comercial do controle biológico no campo.

Os microrganismos endofíticos, devido a sua capacidade de viver no interior dos tecidos das plantas, escapam desta competição com outros microrganismos do solo (Misaghi e Donndelinger, 1990), demonstrando melhor adaptação a esse ambiente competitivo, beneficiando-se do catabolismo de metabólitos das plantas (McInroy e Kloepper, 1995) e tornando-se, desta forma, candidatos potenciais para o controle biológico de nematóides depois de sua penetração na raiz. No entanto, é escasso o conhecimento sobre microorganismos endofíticos não patogênicos às plantas hospedeiras e menos ainda se sabe sobre o seu papel no controle de fitonematóides. No Brasil, nenhuma pesquisa foi ainda realizada sobre esse assunto, necessitando, portanto, de estudos sobre a ocorrência desses microrganismos nas nossas condições, bem como o seu potencial para o controle biológico de fitonematóides.

Dessa forma, objetivou-se, no presente trabalho:

- 1- Isolar e caracterizar bactérias endofíticas do sistema radicular de diferentes espécies de plantas.
- 2- Avaliar, *in vitro*, o efeito dos metabólitos produzidos pelos isolados bacterianos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*.
- 3- Avaliar, em casa-de-vegetação, o potencial dos isolados bacterianos obtidos para o controle biológico de *Meloidogyne javanica* em tomateiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A sanidade de plantas é determinada por inúmeras interações bióticas e abióticas com plantas em diferentes tipos de solo. Este aspecto, relativamente pouco explorado, tem recebido hoje particular atenção devido a oportunidade de aplicação dos desenvolvimentos tecnológicos na exploração de microrganismos benéficos que habitam as raízes de plantas (Schroth e Hancock, 1982), de forma endofítica ou na superfície.

Há diversas definições para o termo endofítico, as quais, em geral, incluem fungos e bactérias (Chanway, 1996). Fungos endofíticos foram intensamente revisados nos últimos 10 anos (Siegel, Latch e Johnson, 1987; Carrol, 1988; Clay, 1988;) e essas revisões também focalizaram a importância das bactérias.

Conceitualmente, ^{*}bactérias endofíticas foram definidas por Kado (1992) como bactérias que residem dentro de tecidos de plantas vivas sem causar dano ou benefício garantindo apenas residência. Essa definição é considerada bastante restrita, pois exclui a possibilidade das bactérias endofíticas desenvolverem relações simbióticas com seu hospedeiro (Hallmann et al., 1997). Por outro lado, Quiespel (1992) considera endofíticas apenas as bactérias que estabelecem uma endossimbiose com a planta, por meio da qual a planta recebe um benefício ecológico com a presença do simbionte, como um aumento da tolerância ao estresse ou promoção do crescimento. Essa definição também é restrita, uma vez que somente aquelas bactérias que conferem um benefício à planta são consideradas, excluindo aquelas que têm um efeito neutro ou desprezível na planta. Em relação às bactérias associadas ao filoplano, Beattii e Lindow (1995) acreditam ser mais apropriado considerar os termos epifítico e endofítico como dois extremos de um espectro que reflete o padrão de crescimento de bactérias

foliares que como dois grupos distintos de organismos. Esses autores sugerem que uma troca ativa ocorra entre as populações interna e externa de um isolado bacteriano. Enquanto tudo isso é uma intrigante teoria, a maioria das bactérias é capaz de existir como epifítica ou endofítica (Hallmann et al., 1997). Em uma revisão recente, Hallmann et al. (1997) consideraram como bactéria endofítica aquela que pode ser isolada de um tecido de planta desinfestado superficialmente ou extraída de dentro da planta. Esta definição inclui bactérias colonizadoras internas com aparente efeito neutro, bem como as simbiontes. Além disso, inclui também bactérias que, durante sua fase endofítica, flutuam entre a colonização endofítica e epifítica.

A teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti (1926), citado por Hallmann et al. (1997). Desde o início da década de 40, têm sido numerosos os relatos de bactérias endofíticas nativas em vários tecidos de plantas, incluindo sementes e óvulos (Mundt e Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet e Hollis, 1948), raízes (Philipson e Blair, 1957) caules e folhas (Henning e Willforth, 1940, citados por Hallmann et al., 1997) e frutos (Samish, Etinger-Tulczynska e Bick, 1961). Bactérias isoladas de tecidos internos de plantas sadias compreendem aproximadamente 129 espécies, representando cerca de 54 gêneros (Mundt e Hinkle, 1976; Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; McInroy e Kloepper, 1995; Sturz, 1995; Hallmann et al., 1997), com predominância de espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium*.

Os primeiros relatos consideravam as bactérias endofíticas como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou patógenos latentes (Hollis, 1951; Thomas e Graham, 1952). Pesquisas mais recentes têm demonstrado que bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta e reduzir sintomas causados por diversos fitopatógenos (Van Peer e Schippers, 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Kloepper, Wei e Tuzun 1992;

Pleban, Ingel e Chet, 1995). Da mesma forma, a baixa tolerância ao estresse de plantas axênicas é, às vezes, parcialmente atribuída à ausência de microrganismos endofíticos (Hallmann et al., 1997). Atualmente, as pesquisas têm focado os efeitos benéficos das bactérias endofíticas (Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; Kempe e Sequeria, 1983; Scheffer, 1983; Lalande et al., 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Klopper, Wei e Tuzun, 1992; Chen et al., 1994) e sua ecologia (Misaghi e Donndelinger, 1990; Mahaffee et al., 1997), além da busca por compreender melhor a forma como interagem com suas plantas hospedeiras.

2.1 Ocorrência de bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas já foram detectadas em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos. Hollis (1951) observou a predominância de *Bacillus megatherium* nos tecidos de sementes, hastes e tubérculos de batata, enquanto De Boer e Coperman (1974), estudando a população endofítica bacteriana dessa planta e sua significância na diagnose da podridão anelar (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), isolaram vários gêneros bacterianos de tubérculos e hastes, sendo que *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Bacillus* foram os mais frequentemente encontrados. Vários gêneros de bactérias foram encontrados por Samish, Etinger-Tulczynska e Bick (1963), com maior frequência dentro de tomate, pepino, ervilha e feijão verde, e menos frequentemente em melão e banana.

Gardner, Feldman e Zablutowicz (1982) estudando o comportamento de bactérias encontradas no xilema de citros, isolaram *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Serratia* do fluido xilemático de raízes dessas plantas. Um grande número de bactérias foi observado na zona de emergência de raízes laterais, colonizando os vacúolos de células do parênquima cortical e

elementos do xilema, quando Jacobs, Bugbee e Gabrielson (1985) enumeraram, localizaram e caracterizaram bactérias endofíticas associadas a raízes de beterraba, utilizando técnicas de imunomarcção com ferritina em microscopia eletrônica de varredura. Embora em menor número e maior estabilidade populacional, muitas bactérias também foram observadas colonizando os tecidos intracelularmente. Do xilema de raízes de alfafa, Gagné et al. (1987), isolaram *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., além de bactérias gram-positivas e gram-negativas não identificadas.

Trabalhando com algodoeiro livre de sintomas de doenças, Misaghi e Donndelinger (1990) isolaram espécies *Erwinia*, *Bacillus*, *Clavibacter* e *Xantomonas* de botões florais, caules e raízes. *Pseudomonas fluorescens*, *P. marginalis*, *P. corrugata* e outras espécies de *Pseudomonas*, além de *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella terrigena* e *Vibrio* sp. foram isoladas de plantas de milho (Fisher, Petrini e Scott, 1992). Esses autores observaram maior densidade populacional em amostras de colmos basais, quando comparadas com aquelas do colmo retiradas próximo ao ápice da planta. McInroy e Kloepper (1995) relataram que a flutuação populacional bacteriana em algodoeiro é devido à colonização diferencial por estirpes específicas, o que mostra uma íntima relação entre os tecidos específicos de uma planta e seus colonizadores. Nos tecidos internos de pereiras, Whitsides e Spotts (1991) detectaram alta frequência e ampla distribuição de *Pseudomonas syringae*. Bell et al. (1995), estudando bactérias colonizadoras do xilema de videira, observaram diferenças nas populações de endofíticas e rizobactérias.

Algumas dessas bactérias endofíticas relatadas são fitopatógenos nos tecidos de plantas livres de sintomas de doenças ou plantas não hospedeiras (Bugbee, Gudmestad e Nolte, 1987), enquanto outras não causam doenças em plantas.

Bactérias diazotróficas como *Herbaspirillum spp.*, *Azoarcus spp.* e *Acetobacter spp.* são endofíticas obrigatórias. Essa característica, descoberta recentemente, parece explicar a contribuição de fixação de N_2 muito mais eficiente das associações endofíticas que das associações rizosféricas (Döbereiner, Baldani e Baldani, 1995). *Herbaspirillum seropedicae* foi isolado originalmente de raízes e solo da rizosfera de cereais (Baldani et al., 1986). Hoje tem sido isolado de um grande número de raízes, colmos e folhas, mas não de outras famílias de plantas (Olivares et al., 1993). *Acetobacter diazotrophicus* é a única espécie do gênero capaz de fixar N_2 e sua ocorrência é bastante restrita, tendo sido encontrada em associação com plantas que se propagam vegetativamente e que contêm altas concentrações de açúcar como cana-de-açúcar, batata-doce e capim *Cameroon* (Döbereiner, 1992). Isto indica que seu habitat e distribuição espontânea são limitadas a essas plantas (Paula, Siqueira e Döbereiner, 1993). Segundo Reinhold-Hurek et al. (1993), bactérias do gênero *Azoarcus* tem sido repetidamente encontradas na gramínea "Kallar Grass", que ocorre no Paquistão. Os autores relatam uma colonização do interior das raízes da planta, sugerindo uma transferência mais eficiente de metabólitos entre o hospedeiro e a bactéria. A colonização do interior de raízes por *Azospirillum spp.* foi observada a partir do final dos anos 70 (Patriquin e Döbereiner, 1978; Schank et al., 1979; Umali-Garcia et al., 1980). Patriquin, Döbereiner e Jain (1983) mostraram que *Azospirillum spp.* colonizou raízes internamente, incluindo o xilema, espaços intercelulares e o córtex. Esses autores sugeriram que a localização da bactéria dentro da raiz facilitaria a troca de substrato e produtos com a planta. O efeito mais eficiente da inoculação com isolados de *Azospirillum spp.* obtido de raízes esterilizadas superficialmente em relação aos isolados obtidos do solo, tem sido confirmado em experimentos com milho, sorgo e trigo (Baldani et al., 1986; Pereira et al., 1988).

A relação entre a maioria dessas bactérias e o ataque de nematóides ainda não foi estabelecida.

2.2 Métodos de isolamento de bactérias endofíticas

A metodologia utilizada é extremamente importante e limitante nas investigações sobre bactérias endofíticas. O método utilizado para remover a bactéria das raízes pode afetar a estimativa da sua densidade populacional (Kloepper et al., 1991a). Dessa forma, o procedimento de isolamento para bactérias endofíticas é de grande importância para pesquisa com esses organismos e, sendo assim, os métodos desenvolvidos baseiam-se nas definições propostas para o termo endofítico.

Teoricamente, um procedimento de isolamento deve somente recuperar a população total interna da planta. Contudo, a desinfestação superficial incompleta do órgão da planta, a adsorção de células bacterianas às estruturas celulares ou a penetração do produto desinfestante os tecidos, resultam na perda de alguns endofíticos (Hallmann et al., 1997). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para o isolamento de bactéria endofíticas, cada uma apresentando vantagens e desvantagens. O pesquisador deve selecionar a técnica específica que melhor se adeque aos objetivos da pesquisa em questão.

Os procedimentos mais comuns para isolamento de bactérias endofíticas foram baseados na trituração de tecidos de plantas desinfestados superficialmente usando vários desinfestantes, incluindo hipoclorido de sódio (Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; Fisher, Petrini e Scott, 1992; Hinton e Bacon, 1995; Quadt-Hallmann, Benhamou e Kloepper, 1997; Quadt-Hallmann, Hallmann e Kloepper, 1997), etanol (Gagné et al., 1987; Fisher, Petrini e Scott, 1992; Dong et al., 1994), peróxido de hidrogênio (Misaghi e Donndelinger,

1990; McInroy e Klopper, 1994), bicloreto de mercúrio (Hollis, 1951; Gagné et al., 1987; Srisikandarajah et al., 1993), ou a combinação de duas ou mais dessas substâncias (Caetano-Anollés, Favelukes e Bauer, 1990; Pleban, Ingel e Chet, 1995), seguida por diversas lavagens em água ou soluções tampões esterilizadas. Devido a alta toxicidade e persistência do cloreto de mercúrio, este desinfestante deve ser restrito aos tecidos de plantas que não possam ser desinfestados por outros procedimentos (Hallmann et al., 1997). Detergentes superficiais como Tween 20 (Pleban, Ingel e Chet, 1995), Tween 80 (Sturz, 1995) ou Triton X-100 (Misaghi e Donndelinger, 1990; Musson, McInroy e Klopper, 1995) podem ser adicionados para reduzir a tensão superficial e permitir que os desinfestantes alcancem sítios protegidos e reentrâncias na superfície da planta, além de células epidérmicas danificadas. Dependendo da espécie, idade e parte da planta (raízes, caules, folhas ou sementes), a concentração do desinfestante usado varia e necessita ser otimizada para cada situação.

Para garantir a eficácia da desinfestação superficial, outras etapas foram acrescentadas ao processo. Visando a retirada de toda microbiota epifítica, com o desalojamento de todas as bactérias porventura remanescentes após a desinfestação, o emprego do ultra-som tem se mostrado eficiente no processo de extração e isolamento de bactérias endofíticas (Assis et al., 1996; Mariano et al., 1997; Assis et al., 1998). Outra adaptação da técnica de desinfestação superficial envolve gotas de etanol no tecido da planta e flambagem da superfície (Dong et al., 1994).

Após a desinfestação superficial, o tecido da planta é triturado com pistilo em almofariz ou com triturador mecânico em água esterilizada, soluções tampão ou meios líquidos. O triturado é então processado para enumeração das bactérias.

A técnica da trituração é dependente da completa desinfestação superficial, a qual nem sempre é fácil de ser conseguida. Teoricamente, o

contaminante superficial deve ser morto ou tornar-se inibido no seu crescimento, sem afetar os demais microrganismos dentro do tecido da planta, o que, na prática, é quase impossível, uma vez que o desinfestante penetraria também no tecido da planta (Hallmann et al., 1997). A aplicação da concentração de desinfestante necessária para matar as células bacterianas da superfície da planta é na maioria das vezes detrimental a algumas bactérias internas, especialmente àquelas do córtex radicular, reduzindo o número total da comunidade endofítica nativa (Hallmann et al., 1997).

A extensão da penetração dos desinfestantes superficiais dentro do tecido da planta pode ser visualmente demonstrada pela coloração da raiz com uma solução tampão fosfato-tetrazólio (Patriquin e Dobereiner, 1978) e observação do desenvolvimento da coloração nas células bacterianas. Uma vez que somente células metabolicamente ativas reduzem o tetrazólio, células bacterianas mortas pelo desinfestante superficial não se colorirão. Outra opção seria o uso de corantes apoplásticos, como o di-sódio 4,4'-bis (2-Sulfostiril) bifenil ou trisódio 3-hidroxi-5,8,10-pirenotrissulfonato (PTS), para monitorar a progressão relativa do desinfestante aplicado (Peterson, Emanuel e Humphreys, 1981).

Devido a essas limitações experimentais, o maior compromisso é aliar um procedimento de desinfestação superficial ótimo com um procedimento que reduza a penetração do desinfestante no tecido da planta.

Para diminuir a possibilidade de recuperação de contaminantes superficiais, o controle da desinfestação deve ser incluído para monitorar a eficiência do procedimento para cada amostra. Somente se não ocorrer crescimento bacteriano no controle depois de determinado tempo, a bactéria recuperada deverá ser considerada endofítica. Os seguintes controles têm sido aplicados com sucesso: imersão das raízes em caldo nutriente (Gagné et al., 1987), transferência de 0,1ml da solução de lavagem final para tubos testes com

meio de crescimento bacteriano (McInroy e Kloepper, 1994) ou pressão do tecido da planta desinfestado superficialmente no meio nutriente (Pleban, Ingel e Chet, 1995; Shishido, Loeb e Chanway, 1995). Uma comparação dos três métodos mencionados resultou em porcentagens de contaminação similares para as três técnicas (Musson, McInroy e Kloepper, 1995). Embora esses controles possam ajudar a detectar a desinfestação superficial insuficiente, algumas células bacterianas podem ainda sobreviver em espaços protegidos sob células epidérmicas e corticais danificadas, como demonstrado por Quadt-Hallmann e Kloepper (1996) usando microscopia eletrônica.

A vantagem da técnica da trituração é que ela pode ser usada para quase todos os tecidos de plantas, incluindo flores, frutos e sementes. Bactérias heterotróficas são recuperáveis de todos os tecidos internos e são minimamente afetadas pela adsorção às partes da planta, uma vez que o tecido triturado é plaqueado (Hallmann et al., 1997). Contudo, essa técnica não pode ser usada para examinar bactérias de nichos físicos específicos (colonização intracelular x extracelular, cortical x tecido vascular) e envolve grande volume de trabalho exigindo o controle da desinfestação para cada amostra. Além disso, a completa desinfestação superficial é difícil de ser conseguida e, sendo assim, alguns colonizadores superficiais podem ser recuperados (Hallmann et al., 1997). No entanto, as técnicas de desinfestação superficial e trituração são utilizadas para descrever um amplo espectro de endófitos ocorrendo nos tecidos totais da planta.

Para superar os problemas relativos à desinfestação, métodos alternativos foram desenvolvidos. Uma técnica usando vácuo foi utilizada com sucesso para extrair suco xilemático de raízes de plantas perenes, como videira (Bell et al., 1995) e citros (Gardner, Feldman e Zablotowicz, 1982). A bomba de pressão Scholander foi usada para extrair suco de algodoeiro e de outras culturas agrícolas (Hallmann, Kloepper e Rodríguez-Kábana, 1997). O comum às duas técnicas é que o suco da planta coletado consiste de fluidos dos elementos

condutores e dos espaços intercelulares adjacentes, representando dois nichos físicos considerados favoráveis para a colonização sistêmica da bactéria (Hallmann et al., 1997).

A comparação entre a comunidade bacteriana recuperada de raízes de algodoeiro pelas técnicas da trituração e da bomba de pressão indicou que somente uma parcela das bactérias endofíticas é recuperada pela técnica da bomba de pressão. *Bacillus* spp., grupo predominante em amostras de solo e rizosfera, bem como na comunidade endorrízica de pepineiro, foi somente recuperado pela técnica da trituração, enquanto *Pseudomonas* spp., comumente relatada como endofítica, dominou a comunidade bacteriana recuperada com a técnica da bomba de pressão (Hallmann, Kloepper e Rodríguez-Kábana, 1997). Além dessas diferenças qualitativas, diferenças quantitativas no tamanho da população total recuperada pelas duas técnicas foram também observadas. A técnica da trituração recuperou números consistentemente maiores de bactérias endofíticas quando comparada às técnicas da bomba de pressão (Hallmann, Kloepper e Rodríguez-Kábana, 1997) ou de vácuo (Bell et al., 1995), o que pode ser explicado pela maior porção de nichos físicos nos tecidos internos das plantas sendo amostrados quando comparados com o isolamento mais seletivo de colonizadores de tecidos vasculares e espaços intercelulares pela técnica de extração por pressão ou vácuo (Hallmann et al., 1997).

Diversos controles, como raízes imersas em uma suspensão bacteriana antes da extração, devem ser incluídos em experimentos usando essas técnicas para confirmar que contaminantes superficiais não serão forçados da superfície para o sistema vascular pela aplicação de vácuo ou pressão, resultando em caracterização endofítica enganosa (Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; Hallmann, Kloepper e Rodríguez- Kábana, 1997). Para eliminar a possibilidade de ruptura da estrutura celular da planta, a aplicação do vácuo e pressão deve ser realizada lentamente e não exceder o ponto de murcha permanente da espécie de

planta em questão (Hallmann et al., 1997). Embora as técnicas de pressão e vácuo estimem um número total de bactérias endofíticas menor que o procedimento da trituração, elas fornecem o benefício de isolar endofíticos seletivamente dos elementos condutores, os quais são reconhecidos colonizadores sistêmicos. Por outro lado, requerem plantas mais robustas, que possam ser manipulados manualmente e que resistam à aplicação de pressão e vácuo. Tecidos mais tenros de espécies herbáceas ou plântulas podem não resistir ao tratamento, o que limita a utilização prática dessa técnica para certas espécies de plantas e de tecidos (Hallmann et al., 1997).

A terceira forma de recuperação de bactérias endofíticas de tecidos de plantas é a centrifugação. Essa técnica é comumente empregada para coletar fluidos intercelulares de tecidos de plantas (De Wilt e Spickman, 1982), mas também extrai bactérias endofíticas de fluidos intercelulares e vasculares, da mesma forma que fazem os métodos de vácuo e pressão. Dong et al. (1994) usaram a técnica da centrifugação para remover fluido intercelular assético de caules de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e relataram que este fluido produziu culturas puras de uma bactéria produtora de ácido (aproximadamente 10^4 UFC/ml), idêntica à cultura tipo *Acetobacter diazotrófico*. Usando a técnica da centrifugação, os autores imergiram fragmentos de caule de 3-4cm de comprimento em etanol e flambaram os mesmos para matar os contaminantes superficiais. Dependendo do tamanho dos fragmentos, eles foram centrifugados em tubos tipo Eppendorf ou tubos de vidro maiores. Através da centrifugação acima de 3000g, a maioria das soluções apoplásticas puderam ser removidas. A aplicação do crio-exame ao microscópio eletrônico (crio-SEM), dos fragmentos do caule após a centrifugação, verifica-se se as células estão ainda intactas e se nenhum fluido do simplasto foi deslocado (Hallmann et al., 1997). Esta técnica também requer desinfestação superficial do material planta, uma vez que os tecidos entram em contato com o fluido durante a centrifugação. Ao contrário

dos métodos de pressão e de vácuo, a técnica da centrifugação aplica-se a tecidos de plantas tenros e delicados e, embora consuma tempo para desinfestação superficial, diversas amostras podem ser centrifugadas juntas, tomando o tempo total requerido menor que o das outras técnicas (Hallmann et al., 1997).

A decisão sobre qual o melhor método a ser utilizado para objetivos específicos é influenciada por critérios tais como o nicho físico de interesse e fatores dependentes da planta (espécie, idade e tecido), bem como a viabilidade da fonte e número total de amostras a serem processadas. A aplicação e comparação de diferentes técnicas oferece a vantagem de exame da colonização e localização endofítica de diferentes perspectivas, facilitando a compreensão da função potencial que a bactéria endofítica tem no seu hospedeiro (Hallmann et al., 1997).

2.3 Modos de penetração de bactérias endofíticas

Com exceção daquelas transmitidas por sementes, as quais já estão presentes na planta, bactérias endofíticas potenciais podem primeiro colonizar a superfície das raízes antes de entrarem na planta, encontrando seu hospedeiro por quimiotaxia, eletrotaxia ou acidentalmente (Hallmann et al., 1997).

A motilidade de associações benéficas bactéria-rizosfera tem sido descrita para diversas bactérias como *Alcaligenes faecalis*, *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* (Bashan, 1986b; You et al., 1995). Pelo uso de mutantes induzidos Tn-5 de *Alcaligenes faecalis* com respostas fracas a atrativos e mutantes com síntese deficiente ou superprodução de exopolissacarídeos (EPSs), a fixação de *Alcaligenes faecalis* às raízes de plantas de arroz foi diferenciada em três níveis: adsorção da bactéria à superfície da raiz hospedeira (rápida, mas fraca interação entre bactéria e planta hospedeira),

adesão à superfície da raiz (com forte interação) e colonização da superfície com algumas células entrando na raiz de arroz (You et al., 1995). Um modelo similar de fixação foi relatado para *Azospirillum brasilense* em raízes de trigo (Bashan e Holguin, 1993; Michels, Croes e Vanderleyden, 1991).

Geralmente, a entrada de bactérias nos tecidos da planta pode ser via estômatos, lenticelas, ferimentos (incluindo tricomas quebrados), área de emergência de raízes laterais e germinação de radículas (Huang, 1986). Contudo, a principal entrada de bactérias endofíticas parece ser através de ferimentos que naturalmente ocorrem como resultado do crescimento da planta ou através de pelos radiculares e conjunções epidérmicas (Sprent e Faria, 1988). Diversos autores têm relatado a colonização extensiva de zonas de emergência de raízes secundárias por bactérias endofíticas (Patriquin e Dobereiner, 1978; Jacobs, Bugbee e Gabrielson, 1985; Reinhold e Hurek, 1988; Lamb, Tonkyn e Kluepfel, 1996; Mahaffee et al., 1997b). Devido aos rompimentos da endoderme nesses pontos, as bactérias podem ser observadas colonizando o córtex e se estendendo à endoderme e ao tecido vascular (Patriquin e Dobereiner, 1978; Reinhold e Hurek, 1988; Mahaffee et al., 1997). A importância da formação de raízes laterais para a entrada das bactérias é reforçada pela observação de que *Bacillus polymyxa* foi recuperado de dentro de plântulas de pepino somente depois que raízes laterais foram desenvolvidas (Shishido, Loeb e Chanway, 1995).

Ferimentos de plantas, geralmente induzidos por fatores bióticos (fungos, fitonematóides, insetos) ou fatores abióticos (aração, flutuações de temperaturas extremas, enxertia, podas de raízes), estão presentes em todos os agroecossistemas e são provavelmente os principais fatores para penetração de bactérias (Hallmann et al., 1997). Por exemplo, ferimentos artificialmente produzidos pela adição de nematóides ao solo (Hallmann et al., 1998) ou por carborundum na suspensão bacteriana, antes da inoculação da folha (Quadt-Hallmann e Kloepper, 1996), aumentaram a densidade populacional interna de

bactérias endofíticas aplicadas. Além de abrirem portas de entrada, os ferimentos também criam condições favoráveis para aproximação da bactéria pela liberação de exsudatos de plantas, os quais servem como substrato para a bactéria (Hallmann et al., 1997).

Os ferimentos e raízes laterais não são, contudo, imprescindíveis para a entrada da bactéria endofítica. Plântulas em crescimento com o mínimo de distúrbios em meio líquido ou em ágar-água foram penetradas por bactérias endofíticas bem antes da emergência de raízes laterais (Levanony et al., 1989; Quadt-Hallmann, Benhamou e Kloepper, 1997). Uma vez que plantas controle não tratadas ficaram livres das endofíticas, as bactérias observadas podem indicar penetração ativa, hipótese sustentada pela presença de enzimas celulolíticas e pectinolíticas produzidas por numerosas bactérias endofíticas como *Azoarcus* sp. (Hurek et al., 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas e Kaiser, 1991) e *Pseudomonas fluorescens* (Quadt-Hallmann, Benhamou e Kloepper, 1997). A degradação enzimática de paredes de células de plantas por essas bactérias foi somente observada quando elas colonizaram a epiderme radicular, mas nunca os espaços intercelulares do córtex, o que sugere que a bactéria endofítica induz à produção de celulase e pectinase somente para a penetração na planta hospedeira (Hallmann et al., 1997).

Embora essas observações demonstrem a possibilidade de mecanismos de penetração ativa por algumas bactérias, muito pouco é conhecido sobre a origem e regulação dessas enzimas. Assim, a penetração ativa é ainda controvertida. As bactérias do solo mostram uma maior frequência na produção de enzimas hidrolíticas que as bactérias habitantes do xilema, sugerindo que seja diferente para as bactérias endofíticas sistêmicas conseguirem entrar na planta via produção de enzimas hidrolíticas (Bell et al., 1995). Contudo, enzimas hidrolíticas podem somente ser produzidas por bactérias endofíticas durante o início da fase de invasão e não depois de estarem residindo no tecido da planta,

como indicado por Behamou, Bélanger e Paulitz (1996). A liberação de constituintes de enzimas degradadoras de paredes de células por bactérias endofíticas, no entanto, é indesejável, uma vez que isso confere patogenicidade à planta (Collmer, Berman e Mount, 1982).

2.4 Bactérias endofíticas no controle biológico de fitopatógenos

Bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante aos patógenos de plantas, especialmente os vasculares, o que pode favorecê-las como candidatas potenciais a agentes de biocontrole. Além disso, trabalhos intensivos com agentes de biocontrole rizosféricos mostraram recentemente que 5 de 6 rizobactérias, as quais induziram resistência sistêmica em pepineiro, exibiram colonização externa e interna da raiz (Kloepper, Wei e Tuzun, 1992).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de antagonismo envolvidos na ação das bactérias endofíticas. Encontram-se na literatura, porém, algumas sugestões de mecanismos, como a competição pelos mesmos sítios de colonização dos patógenos e a indução de resistência sistêmica. Independente do mecanismo, no entanto, os resultados parecem promissores.

Bactérias endofíticas têm sido estudadas no controle de doenças fúngicas. Brooks et al. (1994) selecionaram, *in vitro*, isolados antagonísticos a *Ceratocystis fagacearum*, agente causal da murcha do carvalho, conseguindo uma redução de 39% de plantas doentes em condições de casa-de-vegetação. Bactérias endofíticas também mostraram controle significativo nos sistemas *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro (Chen et al., 1995), *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani* em batateira (Nowak et al., 1995), *Rhizoctonia solani* em algodoeiro e *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro (Pleban, Ingel e Chet 1995). Da mesma forma, diversas bactérias endofíticas isoladas de sementes de arroz exibiram atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*,

Pythium myriotylum, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* (Mukhopadhyay et al., 1996).

Hinton e Bacon (1995) relataram que *Enterobacter cloacae*, uma bactéria endofítica isolada de milho, exibiu antibiose *in vitro* contra *Fusarium moniliforme*. Considerando que isso indica que metabólitos bacterianos estejam envolvidos no controle de *Fusarium moniliforme*, Chen et al. (1994) sugeriram que o biocontrole afeta os isolados como resultado do aumento da defesa do hospedeiro pelos metabólitos bacterianos. No entanto, embora sejam numerosos os relatos de estudos em casa-de-vegetação, somente poucos deles confirmaram o efeito de bactérias endofíticas no controle de doenças em plantas em condições de campo (Wei, Kloepper e Tuzun, 1996).

A atividade antagonística de bactérias endofíticas contra bactérias fitopatogênicas também tem sido relatada. Van Buren, Andre e Ishimaru (1993) estudando o efeito de 198 isolados no controle de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*, agente causal da podridão anelar em batateira, verificaram que quatro deles preveniram o aparecimento de sintomas da doença em casa-de-vegetação. O isolado 89B-27 de *Pseudomonas fluorescens* e o isolado 90-166 de *Serratia marcescens*, foram observados como indutores de resistência em pepineiro a *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, bem como a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerium* e *Colletotrichum orbiculare* (Liu, Kloepper e Tuzun, 1995a, b e c). Bactérias endofíticas também exerceram um papel na resistência, o que foi observado em linhagens de algodoeiro (resistência múltipla adversa – MAR) (Bird, 1982).

No Brasil, alguns trabalhos têm sido feitos. Assis et al. (1998), estudando o potencial antagonístico de bactérias endofíticas no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra em repolho, verificaram 70,8% de redução da incidência da doença (RID) em casa-de-vegetação e 77% de redução da severidade da doença (RSD) em condições de

campo. Utilizando isolados obtidos de *Ipomea* sp., Nascimento (1998) observou, em casa-de-vegetação, redução significativa na incidência de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro.

Há algumas evidências de que bactérias endofíticas possam contribuir para o controle de nematóides fitoparasitas (Hallmann et al., 1995) e insetos (Dimoch, Beach e Carlson, 1988). Contudo, o controle desses parasitas parece ser mais complexo e difícil que o de fungos ou bactérias patogênicos, uma vez que os danos causados por nematóides e insetos ocorrem como resultado de seu hábito alimentar e migração interna, o que limita a eficácia do antagonismo bacteriano (Hallmann et al., 1997). Todavia, fitonematóides endoparasitas sedentários podem ser um alvo interessante para o antagonismo endofítico, já que eles permanecem dentro da planta por várias semanas e alimentam-se em um único local (Hallmann et al., 1997). Com base nisso, Hallmann et al. (1995) testaram, em casa-de-vegetação, 72 isolados obtidos de plantas de pepino e algodão no controle de *Meloidogyne incognita*. Os resultados mostraram que *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas vesicularis*, *Serratia marcescens* e *Sphingomonas paucimobilis* reduziram em até 50% a infecção pelo nematóide em plantas de pepino, mostrando que rizobactérias endofíticas devem ser avaliadas em estratégias para controle biológico de fitonematóides.

2.5 Promoção de crescimento de planta por bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas têm sido associadas com a promoção do crescimento em diversas culturas, incluindo plantas de tomate, alface (Bashan et al., 1989; Van Peer e Schippers, 1989; Nowak et al., 1995), batata (Van Peer e Schippers, 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Sturz, 1995), milho (Lalande et al., 1989; Hinton e Bacon, 1995), pepino (Van Peer e Schippers,

1989; Kloepper, Wei e Tuzun, 1992; Nowak et al., 1995), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989). De acordo com Sturz (1995), aproximadamente 10% de isolados bacterianos recuperados de dentro de tubérculos de batata mostraram promoção de crescimento de planta. O isolado não fluorescente de *Pseudomonas* sp., PsJN, induziu aumento significativo no número de raízes de batateira (24-196%), peso de matéria seca de raiz (44-211%) e comprimento de caule (26-28%), bem como aumento de formação de pelos foliares (55-11%), ramificações secundárias e conteúdo total de lignina (43%) (Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991).

A inoculação de arroz com a bactéria endofítica diazotrófica *Azoarcus* sp., isolado BH72, promoveu significativamente o crescimento das plantas (Hurek et al., 1994). Nesse caso particular, a promoção do crescimento também ocorreu com mutantes Nif, indicando que a fixação de N₂ por *Azoarcus* sp. não foi aparentemente envolvida na promoção do crescimento. Contudo, os autores acreditam que a promoção do crescimento observada pode ter sido causada pelo aumento dos minerais da planta e fornecimento de água, associados com a colonização por *Azoarcus* sp..

Alguns isolados de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* e *Azospirillum* produzem reguladores de crescimento de plantas como etileno, auxinas ou citocininas, sendo, dessa forma, considerados como agentes causadores da alteração do crescimento e desenvolvimento de plantas (Bashan e Holguin, 1997). Além do mecanismo direto para promoção do crescimento, esse fato pode ocorrer devido à supressão da microbiota deletéria pela introdução de endófitos (Kloepper et al., 1991b). Van Peer e Schippers (1989) observaram que plântulas de tomate inoculadas com o isolado WCS417r de *Pseudomonas* sp. mostraram aumento no crescimento, acompanhado por densa colonização do isolado aplicado nos tecidos internos da raiz e um

consequente deslocamento de *Pseudomonas* spp. endofíticas indígenas, deletérias ao crescimento de plantas.

Os efeitos benéficos de bactérias endofíticas variam, mas parecem operar através de mecanismos similares àqueles descritos para rizobactérias promotoras de crescimento (Kloepper et al., 1991b; Höflich, Wiehe e Kühn, 1994). Contudo, devido às diferenças dos habitats colonizados, bactérias endofíticas apresentam-se como uma ferramenta adicional para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico (Hallmann et al., 1997). Pela combinação de uso de bactérias endofíticas com antagonistas da rizosfera e filosfera, um sistema de controle biológico integrado pode ser desenvolvido contra patógenos múltiplos dos tecidos radiculares e foliares (Hallmann et al., 1997).

2.6 Métodos de inoculação de bactérias endofíticas

Para o uso de bactérias endofíticas no campo, métodos práticos de inoculação devem ser desenvolvidos. Em geral, aqueles desenvolvidos para aplicação de inoculantes microbianos na rizosfera e na filosfera são também válidos para bactérias endofíticas (Stack, Kenely e Pettit, 1988; Baker e Hennis, 1990; McIntyre e Press, 1991; Andrews, 1992). Para aplicação de bactérias endofíticas, diversos métodos foram utilizados experimentalmente como variações de tratamento de sementes e irrigação de substrato, injeções em caule, pulverizações foliares de suspensões bacterianas (Fahey et al., 1991; Musson, McInroy e Kloepper, 1995), perfuramento com agulha passada em colônia pura (Chen, et al., 1995), contato de raízes sem extremidades em suspensões bacterianas (Quadt-Hallmann, Hallmann e Kloepper, 1997) e corte do hipocótilo em determinado estágio de desenvolvimento (Kijima et al., 1995).

Testes intensivos de sistemas diferentes de distribuição, incluindo inoculação de diferentes bactérias endofíticas através de ferimentos no caule, imersão das sementes em suspensões bacterianas, revestimento de sementes com metil celulose, pulverização foliar, infiltração a vácuo e imersão de raízes podadas, indicaram que o método de aplicação para introdução da bactéria no tecido da planta é específico para cada isolado (Musson, McInroy e Kloepper, 1995). A empresa Crop Genetics International Ltda. desenvolveu uma técnica de inoculação pela aplicação de uma pressão diferencial, fazendo com que a suspensão bacteriana penetre nas sementes embebidas (Fahey et al., 1991; Turner, Jeffrey e Carlson, 1993). As sementes inoculadas podem ser armazenadas por diversos meses e a aplicação de fungicidas comumente usados não tem impacto adverso na sobrevivência e eficácia da inoculação de bactérias (Hallmann et al., 1997).

Diversos estudos orientados comercialmente indicam a aplicação via grânulos de alginato (Bashan, 1986a). A vantagem desse método é adicionar nutrientes para bactérias específicas, como 'espuma' de leite, ao alginato para aumentar a taxa de sobrevivência bacteriana (Hallmann et al., 1997). Inoculações bacterianas dentro de suspensões de células de plantas e embriões regenerados podem ser outra possibilidade para garantir a colonização precoce da planta pela bactéria endofítica (Bashan e Holguin, 1997).

A aplicação de agentes de biocontrole às folhas e flores pode ser realizada pela pulverização de suspensões bacterianas ou formulações em pó de bactérias liofilizadas (Knudsen e Spurr, 1987). Contudo, pouco é conhecido sobre tamanho de gota, pressão de aplicação e outros detalhes técnicos (Sutton e Peng, 1993).

A vantagem do tratamento de sementes e irrigação do solo é a proteção da plântula desde o início da germinação da semente, enquanto a aplicação bacteriana via pulverização foliar é um método atraente quando aplicado em

combinação com fungicidas e inseticidas (Hallmann et al., 1997). Por combinação de diferentes técnicas de aplicação, bactérias endofíticas podem ser aplicadas, dependendo da necessidade e estágio de crescimento da cultura em questão (Hallmann et al., 1997).

Além de tudo, o tratamento de sementes parece ser um método rápido, economicamente prático e viável para introdução de bactérias endofíticas (Hallmann et al., 1997). Entretanto, a combinação de tratamento de sementes com irrigação do solo ou aplicação foliar pode aumentar a colonização endofítica dentro da planta e a consistência dos efeitos benéficos. O conhecimento a respeito da forma de penetração e colonização das bactérias endofíticas nas plantas, contudo, ainda é limitado e o desenvolvimento da tecnologia de aplicação dependerá do avanço conhecimento sobre a ecologia desses organismos (Hallmann et al., 1997).

2.7 Associação de nematóides com bactérias produtoras de substâncias tóxicas.

Algumas bactérias produzem substâncias tóxicas aos nematóides. Jonhston (1959) observou reduções nas populações de *Tylenchorhynchus martini* em solos saturados de umidade, atribuindo esse fato a *Clostridium butyricum*, bactéria que produz uma mistura de ácido fórmico, acético, propiônico e butírico. Em solo inundado, Hollis e Rodríguez-Kábana (1966,1967) observaram a produção de ácido butírico em concentrações nematicidas.

Segundo Rodríguez-Kábana, Jordan e Hollis (1965), *Desulfovibrio desulfuricans* é uma bactéria anaeróbica redutora de sulfato com propriedades tóxicas a nematóides. Aplicações de bactérias pertencentes ao gênero *Desulfovibrio* em campos de arroz foram eficientes no controle de

Hirschmanniella oryzae (Jacq e Fortuner, 1979). Bactérias do gênero *Chromobacterium* produzem amônia e cianeto, que são potentes nematicidas (Wilt e Smith, 1970).

Bacillus, gênero de bactéria bastante estudado, apresenta algumas espécies consideradas promissoras no controle biológico devido a capacidade de produção de endósporos, os quais são tolerantes às condições de dessecação do solo e calor extremo (Weller, 1988). *Bacillus thuringiensis* é conhecido por produzir uma delta-endotoxina nas células, bem como diversas exotoxinas em meio de cultura (Carneiro, Souza e Belarmino, 1998).

A maioria dos estudos usando espécies de *Bacillus* no controle biológico de nematóides foi feita com grupos parasitas de animais (Bottjer, Bone e Gill, 1985; Bottjer e Bone, 1987; Charles et al., 1994). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado a sua atividade contra fitonematóides. Turingiensiina, a exotoxina termo estável e solúvel produzida por *Bacillus thuringiensis*, mostrou atividade contra *Panagrellus redivivus*, nematóide de vida livre, além de *Aphelenchoides avenae*, *Meloidogyne incognita* (Ignoffo e Dropkin, 1977) e *Heterodoera glycines* (Noel, 1990).

Formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis*, livres de exotoxinas, foram utilizadas com sucesso para o controle de *Meloidogyne incognita* (Sharma, 1993) e *Heterodera glycines* (Sharma, 1994). A delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* produziu efeitos estimulatórios e inibitórios em juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* (Sharma e Gomes, 1996 a e b).

2.8 Efeito dos filtrados de culturas bacterianas sobre fitonematóides

Alguns estudos têm demonstrado o efeito nematicida e nematostático de filtrados de culturas bacterianas. Lizuka et al. (1962) testaram filtrados de 134 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Intensa atividade nematicida foi

apresentada por 69 isolados e os demais apresentaram efeito moderado ou fraco contra *Meloidogyne* sp. Os mesmos autores demonstraram que filtrados de cultura de 9 isolados de *Enterobacter* sp. apresentaram alta atividade nematicida. Filtrados de cultura de *Bacillus cereus*, crescida em meio 'tryptic soy broth' (TSB), mostraram atividade nematicida a J₂ e ovos de *Meloidogyne javanica* (Oka, Chet e Spiegel, 1993). Perda desta atividade foi observada pela redução do pH do meio, fervura ou diálise, sugerindo a possibilidade de que o ingrediente ativo da cultura tenha sido amônia, liberada durante o processo de degradação de peptídeos no meio pela atividade bacteriana. Carneiro, Souza e Belarmino (1998) testaram vinte e um isolados de *Bacillus* spp. em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*, em ensaios *in vitro*. A cultura total e o sobrenadante de *B. thuringiensis brasiliensis* e *B. lateosporus* mataram J₂ recém eclodidos após 24 e 48 horas, enquanto *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis morrisoni* e *B. circulans* causaram apenas imobilização ou redução de movimento. Embora a natureza química dos sobrenadantes não tenha sido determinada, os resultados sugerem a presença de mais de uma toxina com alto poder nematicida.

2.9 Obtenção dos filtrados de culturas bacterianas.

A produção de metabólitos deletérios a fitopatógenos por bactérias tem sido estudada através de testes com filtrados de culturas bacterianas (Lizuka et al. 1962; Elad e Baker, 1985; Freitas e Germida, 1991; Oka, Chet e Spiegel, 1993; Carneiro, Souza e Belarmino, 1998). Os filtrados são obtidos pelo cultivo das bactérias em meio líquido por um período de 5-7 dias com incubação em agitador orbital (100-150 rpm) a 28 °C. Após esse período as células bacterianas são removidas do meio por centrifugação (2.500 – 10.000g) e o sobrenadante

filtrado através de filtro Millipore com 0,22-0,45µm de diâmetro de poro (Elad e Baker, 1985; Freitas e Germida, 1991; Carneiro, Souza e Belarmino, 1998).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, Palo alto, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; COELHO, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R.J.; ROVIRA, A.(eds.) *Advances in biological control of plant diseases*. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p.347-353.
- ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.
- BAKER, C.A.; HENIS, J.M.S. Commercial production and formulation of microbial biocontrol agents. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (eds) *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. New York: A.R. Liss, 1990. p. 334-344.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.36, n.1, p. 86-93, Jan. 1986.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 51, n.5, p. 1089-1098, May 1986a.
- BASHAN, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* towards wheat roots in the soil. *The Journal of General Microbiology*, London, v.132, n. 12, p. 3407-3414, Dec. 1986b.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *The Journal of General Microbiology*, London, v.139, n.2, p. 379-385, Feb. 1993.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* –plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.2, p.103-121, Feb. 1997.

- BASHAN, Y.; REAM, Y.; LEVANONY, H.; SADE, A. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.67, n.5, p.1317-1324, May 1989.
- BEATTIE, G.A. ; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.33, p.145-172, 1995.
- BELL, C.R.; DICKIE, G.A. ; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.41, n.1, p. 46-53, Jan. 1995.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum* Trow. *Planta*, Berlin, v.199, n.1, p.105-176, Jan. 1996.
- BIRD, L.S. The MAR (multi-adversity resistance) system of genetic improvement of cotton. *Plant Disease*, St. Paul, v.66, n.2, p. 172-176, Feb 1982.
- BOTTJER, K.P.; BONE, L.W. Changes in morphology of *Trichostrongylus columbriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of Nematology*, Lawrence, v.19, n.3, p.282-286, Jul 1987.
- BOTTJER, K.P.; BONE, L.W.; GIL, S.S. Nematoda: susceptibility of the egg to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Experimental Parasitology*, Washington, v.60, n.2, p.239-244, 1985.
- BROOKS, D.S.; GONZALES, C.F.; APPPEL, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agent for oak wilt. *Biological Control*, Madison, v.4, n.3, p.373-381, Mar. 1994.
- BUGBEE, W.M.; GUDMESTAD, G.A. ; NOLTE, P. Sugar beet symptomless host for *Corynebacterium sepe-donicum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.5, p. 765-770, May 1987.
- CAETANO-ANNOLES, G.; FAVELUKES, G.; BAUER, W.D. Optimization of surface of legume seed. *Crop Science*, Madison, v.30, n.3, May/June, 1990.

- CAMPOS, V.P. Café: doenças causadas por nematóides. In: VALE; F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (eds) **Controle de doenças de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 1997. v.1, p. 141-170.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; BRIDGE, J.; SIKORA, R. (eds). **Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical**. London: CAB International, 1990. p. 387-430.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SOUZA, I.S.; BELARMINO, L.C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.12-21, jun. 1998.
- CARROL, G. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, San Diego, v.69, n.1, p.2-9, 1988.
- CHANWAY, C.P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.74, n.3, p.321-322, Mar. 1996.
- CHARLES, T.P.; SANTOS, C.P.; SILVA-WERNECK; J.O.; DIAS, J.M.C.S.; RABINOVITCH, L.; GUAYCURUS, T. Efeito de quatro linhagens de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em ovos e larvas de *Haemonchus contortus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.567-569, set./dez. 1994.
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; KLOEPPER, J.W. Biological control potential and population dynamics of endophytic bacteria, in a cotton/*Fusarium* wilt system. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. (eds) **Improving plant productivity with rhizosphere bacteria**. Adelaide: Graphic Services, 1994. p. 191-193.
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Madison, v.5, n.1, p.83-91, May 1995.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defesive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, San Diego, v.69, n.1, p.10-16, 1988.
- COLLMER, A.; BERMAN, P.; MOUNT, M.S. Pectate lyase regulation and bacterial soft-rot pathogens. In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H. (eds) **Phytopathogenic procaryotes**. New York: Academic Publishers, 1982. v. 1, p. 395-422.

- DE BOER, S. H.; COPERMAN, R. J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 54, n. 1, p. 115-122, Jan. 1974.
- DE WILT, P.J.G.M.; SPICKMAN, G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiological Plant Pathology*, Washington, v.21, n.1, p.1-11, Jan. 1982.
- DIMOCH, M.B.; BEACH, R.M.; CARLSON, P.S. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents. In: ROBERTS, D.W.; GRANADOS, R.R. (eds) *Biotchnology, biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management*. Ithaca: Boyce Thompson Institute for Plant Research, 1988. p. 88-92.
- DÖBEREINER J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (eds) *The procaryotes*. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p.2236-2253.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA, 1995. 60p.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugar stems. *Plant Physiology*, Baltimore, v.105, n.4, p.1139-1147, Aug 1994.
- ELAD, Y.; BAKER, R. The role of competition for iron and carbon in supression of chlamyospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 1053-1059, Mar 1985.
- FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARLSON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS; J.H.; HIRANO, S.S. *Microbial ecology of leaves*. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.401-411.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O .; SCOTT, L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize. *Phytopathology*, Cambridge, v.122, n.2, p.299-305, Feb. 1992.

- FREITAS, J.R.; GERMIDA, J.J. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.37, n.10, p.780-784, Oct. 1991.
- FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grow potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, n.3, p.928-936, July 1991.
- GAGNÉ, S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.33, n.1, p.996-1000, Nov. 1987.
- GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWSCZ, R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon root of Florida citrus trees. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.43, n.6, p. 1335-1342, June 1982.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Application of the scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, n. 5, p.411-416, May 1997.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SIKORA, R.A. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* in cucumber. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, n.10, p.1136, Oct. 1995.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.10, p.895-914, Oct. 1997.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, n.7, p.925-937, July 1998.
- HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, Amsterdam, v. 129, n.1, p.117-125, Jan. 1995.

- HÖFLICH, G.; WIEHE, W.; KÜHN, G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, London, v.50, n.10, p.897-905, Oct. 1994.
- HOLLIS, J. P. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, Lancaster, v. 41, n. 4, p. 351-366, Apr. 1951.
- HOLLIS, J.P.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Fatty acids in Louisiana rice fields. *Phytopathology*, St. Paul, v.57, n.9, p.841-847, Sept. 1967.
- HOLLIS, J.P.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Rapid kill of nematodes in flooded soil. *Phytopathology*, St. Paul, v.56, n.9, p.1015-1019, Sept. 1966.
- HUANG, J.S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.24, p. 350-367, 1986.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.76, n.7, p.1913-1923, Apr. 1994.
- IGNOFFO, C.M.; DROPKIN, V.H. Deleterious effect of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil inhabiting, miceliophagous, and plant parasitic nematodes. *Journal of Kansas Entomological Society*, Kansas, v.50, n.3, p.394-398, July 1977.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria with sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.63, n.7, p.1262-1265, July 1985.
- JACQ, V.A.; FORTUNER, R. Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. *Revue de Nematologie*, Paris, v.2, n.1, p.41-50, Jan. 1979.
- JATALA, P. Biological control of parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 24, p. 453-459, 1986.
- JOHNSTON, T.M. Effect of fatty acids mixtures on the rice stylet nematode (*Tylenchorhynchus martini* Fielding, 1956). *Nature*, London, v.183, n.3696, p.1392, 1959.



- ↙ KADO, C.I. Plant pathogenic bacteria. In: BALOWS, A. ; TRÜPER, H.G. (eds.) **The procaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.660-662.
- KEMPE, J.; SEQUERIA, L. Biological control of bacterial wilt potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, n.5, p. 499-503, May 1983.
- KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic-nematodes. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 22, n.4S, p. 621-631, Oct. 1990.
- KERRY, B. R. Nematophagus fungi and the regulation of nematodes populations in soil. **Helminthological Abstract Serie B**, St. Albans, v. 53, n.1, p. -14, Mar. 1984.
- KHAMAS, K.M.; KAISER, P. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.75-79, Nov. 1991.
- KIJIMA, T.; YONAI, K.; OOHASHI, K.; AMAGAI-SANO, M. **Process for biologically preventing dicotyledoneus plant diseases using symbiotical bacteria**. US Patent 5.401.655. 1995.
- KLOEPPER, J. W.; MAHAFFEE, W. F.; McINROY, J. A.; BACKMAN, P. A. Comparative analysis of five methods for recovering rhizobacterial from cotton roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p.953-957, Dec 1991a.
- KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cist (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.139, n.1, p. 75-84, Jan. 1992.
- KLOEPPER, J.W.; WEI, G.; TUZUN, S. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: TJAMOS, E.S. (ed.) **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p.185-191.

- [REDACTED]
- KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.; CREGAN, P.B. (eds) **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991b. p.315-326.
- KNUDSEN, G.E.; SPURR, H.W. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations to control peanut leaf spot. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.5, p.442-445, May 1987.
- LALANDE, R. ; BISSONNETTE, N.; COUtlÉE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, n.1, p. 7-11, Jan. 1989.
- LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A . Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.11, p.1112-1120, Nov. 1996.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, n. 3, p. 207-218, Aug. 1989.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.8, p.843-847, Aug. 1995b.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.6, p. 695-698, June 1995a.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.10, p. 1064-1068, Oct. 1995c.
- LIZUKA, H.; KOMAGATA, T.; KUNII, Y.; SHIBUYA, M. Nematocidal action of microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.26, n.2, p.199, Feb. 1962.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.

- MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-27 and *Enterobacter asburicae* strain JM22. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, 1997. p.180.
- MANKAU, R. Microbial control of nematodes. In: ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; ROHDE, R. A. (eds). **Plant Parasitic Nematodes**. New York: Academic Press, 1981. v. 3, p. 475-494.
- MARIANO, R.L.R.; ASSIA, S.M.P.; MELLO, M.R.F.; MOURA, F.F.; ANDRADE, A.Q.V.; SILVA, G. Método de isolamento de bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.235, ago. 1997. Suplemento.
- MCINROY, J.A. ; KLOPPER, J.W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: O'GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B.(eds) **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft - Germany, 1994. p. 19-28.
- MCINROY, J.A. ; KLOPPER, J.W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, n.2, p.337-342, June 1995.
- MCINTYRE, J.L.; PRESS, L.S. Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Cregan Kluwer, 1991. p. 289-295.
- MICHIELS, K.W.; CROES, C.L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum* Sp7 to wheat roots. **The Journal of General Microbiology**, London , v.137, n. 8, p. 2241-2246, Aug. 1991.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 9, p. 808-811, Sept. 1990.
- MUKHOPADHYAY, K.; GARRISON, N.K.; HINTON, D.; BACON, C.W.; KHUSH, G.S.; PECK, H.D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.134, n.1, p.151-159, Jan. 1996.

- MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.32, n.4, p. 694-698, Apr. 1976.
- MUSSON, G.; MCINROY, J.A. ; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v.5, n.2, p.407-416, July/Dec. 1995.
- NASCIMENTO, A .S. *Bactérias endofíticas no controle de Ralstonia solanacearum e Clavibater michiganensis subsp. michiganensis e tomateiro*. Brasília: UnB. 91p (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia), 1998.
- NOEL, G.R. Evaluation of thuringiensin for control of *Heterodera glycines* on soybean. Supplement to *Journal of Nematology*, Lawrence, v.22, n.4S, p.763-766, Oct. 1990.
- NOVARETTI, W. R. T. Controle biológico de nematóides fitopatogênicos. In: **REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS**, 1, 1986, Piracicaba. Anais... Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 24-25.
- NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; LAZAROVITS, G.; PILAY, V.; STEWART, A. SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetables plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (eds) *Ecophysiology and photosyntetic in vitro cultures*. France: Commissariat à l'énergie atomique, 1995. p. 173-179.
- OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v.3, n.2, p.115-126, Apr./June 1993.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BUENO, F.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Ecologia das bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, p.313, 1993. Suplemento.
- PATRIQUIN, D.; DOBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.24, n.10, p.734-742, Oct. 1978.

- PATRIQIN, D.; DOBEREINER, J.; JAIN, D.K. Site and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.29, n.8, p.900-915, Aug. 1983.
- PAULA, M.A. ; SIQUEIRA, J.O. ; DOBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias endofíticas diazotólicas na cultura da batata doce. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.17, n.3, p.349-356, set./dez. 1993.
- PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.110, n.3, p. 269-274, June 1988.
- PETERSON, C.A.; EMANUEL, M.E.; HUMPHREYS, G.B. Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.59, n.5, p.618-625, May 1981.
- PHILIPSON, M.N.; BLAIR, I.D. Bacteria in clover root tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.3, n.1, p. 125-129, Jan. 1957.
- PLEBAN, S.; INGEL, F; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, London, v. 101, n.3, p. 665-672, May/June 1995.
- QUADT-HALLMANN, A. ; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.3, p.254-259, Mar. 1997.
- QUADT-HALLMANN, A. ; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.6, p.577-582, June 1997.
- QUADT-HALLMANN, A. ; KLOEPPER, J.W. Immunological and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburicae* JM22 different plant species. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.42, n.11, p.1144-1154, Nov. 1996.

- QUIESPEL, A . A search for signals in endophytic microorganisms. In: VERMA, D.P.S. (ed.) **Molecular signals in plant- microb communications**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 471-490.
- REINHOLD, B.; HUREK, T. Location of diazotrophics in the root interior with special attetion to the kallar grass association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.110, n.4, p.259-268, June 1988.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOST, B. VACANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov., and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, n.5, p.574-584, May 1993.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; JORDAN, J.W.; HOLLIS, J.P. Nematodes biological control in rice fields: role of hydrogen sulfide. **Science**, Lousiana, v.148, n. 3669, p.524, Apr. 1965.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Biological control of nematodes: soil amendmets and microbiol agents. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.100, n.1-3, p. 237-247, 1987.
- SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. Microflora within heathy tomatoes. **Applied Microbiology**, Washington, v.9, n.1, p. 20-25, Jan. 1961.
- SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, Davis, v. 28, n.3, p. 259-266, May/June 1963.
- SAYRE, R. M.; STARR, M. P. Bacterial disease and antagonism of nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (eds). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 69-101.
- SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; WEISER, G.C.; ZUBERER, D. A .; BOUTON, J.H.; QUESENBERRY, K.H.; TYLER, M.E.; MILAM, J.R.; LITTELL, R.C. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. **Soil Biological and Biochemistry**, Oxford, v.11, n.3, p.287-295, Mar. 1979.

- SCHEFFER, R.J. Biological control of dutch elm disease by *Pseudomonas* species. *Annals Applied Biology*, London, v.103, n.1, p.21-30, Aug. 1983.
- SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root colonization bacteria. *Science*, Washington, v. 216, n. 4552, p. 1376-1381, June 1982.
- SHARMA, R.D. *Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on barley. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17., 1993, Jaboticabal. Resumos.... Jaboticabal, UNESP, 1993. p.71.
- SHARMA, R.D. Biological control of *Heterodera glycines* with *Bacillus thuringiensis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - SINCOBIOL, 4., 1994, Gramado. Anais... Gramado, EMBRAPA, 1994. p.158.
- SHARMA, R.D.; GOMES, A.C. Effect of *Bacillus* sps. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.20, n.1, p. 53-62, jun 1996a.
- SHARMA, R.D.; GOMES, A.C. Effect of seed treatments with delta-entoxin of *Bacillus* spp. on multiplication of *Heterodera glycines* on soybean and corn. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.20, n.2, p.21-29, dez 1996b.
- SHISHIDO, M.; LOEB, B.M.; CHANWAY, C.P. External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from diifferent root microsites. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.41, n.8, p.707-716-713, Aug. 1995.
- SIDDIQI, M.R. *Tylenchida*: parasites of plants and insects. St. Albans: C. A.B International, 1986. 645p.
- SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; JOHNSON, M.C. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Phytopathology*, Palo alto, v.25, p.295-325, 1987.
- SPRENT, J.I.; FARIA, S.M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.110, n.2, p.157-165, Mar. 1988.

- SRISKANDARAJAH, S.; KENNEDY, I.R.; YU, D; TCHAN, Y.T. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 153, n.2, p.165-178, Jun 1993.
- STACK, J.P.; KENELY, C.M.; PETTIT, R.E. Application of biological control agents. In: MUKERJI, K.G.; GARG, K.L. (eds) *Biocontrol of plant diseases*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 44-54.
- STURZ, A .V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.175, n.2, p. 257-263, Aug. 1995.
- SUTTON, J.C.; PENG, G. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.31, p.473-493, 1993.
- TERVET, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in storage organs healthy plants. *Phytopathology*, Madison, v.38, n.1, p.157-165, Jan. 1948.
- THOMAS JR., D.; GRAHAM, R.W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathology*, Madison, v.42, n.2, p.214, Feb. 1952.
- THOMASON, I. J. Challenges facing nematology: environmental risks with nematicides and need for new approaches. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). *Vistas on nematology*. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 469-476.
- TURNER, J.T.; JEFFREY, L.K.; CARLSON, P.S. Endophytes: an alternative genome for crop improvement. In: BUXTON, D.R.; SHIBLES, R.; FORSBERG, R.A .; BLAD, B.L.; ASAY, R.H.; PAULSEN, G.M.; WILSON, R.F. (eds.) *International crop science*. Madison: Crop Science Society of America, 1993. p.555-560.
- UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D.H.; GASKINS, M.H.; DAZZO, F.B. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.39, n.1, p. 219-226, Jan. 1980.
- VAN BUREN, A .M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C.A . Biological control of the bacterial ring-spot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.12, p.1406, Dec. 1993.

- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 35, n.1, p. 456-463, Jan. 1989.
- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.2, p.221-224, Feb. 1996.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.
- WHITESIDES, S.K.; SPOTTS, R.A. Frequency, distribution, and characterization of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n.4, p. 453-457, Apr. 1991.
- WILT, G.R.; SMITH, R.E. Studies on the interactions of aquatic bacteria and aquatic nematodes. *Water Resources Research Institute Bulletin*, Raleigh, v.1, p.701, 1970.
- YOU, C.B.; LIN, M.; FANG, X.J.; SONG, W. Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. *Soil Biological and Biochemistry*, Queensland, v.27, n.4/5, p.463-466, Apr./May 1995.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO SISTEMA RADICULAR DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS.

RESUMO

NAVES, Rosemeire de Lellis. Isolamento de bactérias endofíticas do sistema radicular de diferentes espécies de plantas. In: _____ Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides. Lavras: UFLA, 2000. Cap 2, p.42-62. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).*

Objetivando verificar o seu potencial antagonico a fitonematóides, bactérias endofíticas foram isoladas do sistema radicular de diferentes espécies de plantas como braquiária (*Brachiaria* sp.), crotalária (*Crotalaria* sp.), milho (*Zea mays*), pimentão (*Capsicum annum* L.), cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e trigo (*Triticum aestivum* L.), coletadas nos municípios de Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci e Alfenas, no estado de Minas Gerais. Para tanto, raízes sadias foram lavadas em água de torneira e submetidas a duas desinfestações superficiais com álcool 50% e hipoclorito de sódio 1%, seguidas por 3 lavagens em solução tampão de fosfato-potássio (PB) 0,02M esterilizada (pH 7,0). Após cada desinfestação, as raízes passaram por um banho de ultra-som por 10 minutos para desalojar de sua superfície qualquer bactéria epifítica remanescente. A seguir, foram fragmentadas e trituradas com almofariz e pistilo esterilizados contendo solução PB. O triturado foi submetido a um banho de ultra-som por 10 minutos para desagregação das partículas e células bacterianas e posteriormente diluído, sendo as diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) plaqueadas em meio 'tryptic soy agar' (TSA). Para verificar a eficiência da desinfestação superficial das raízes, após cada banho de ultra-som a solução PB foi plaqueada em meio TSA. Não havendo crescimento bacteriano dentro de 48 horas, os isolados obtidos foram considerados endofíticos. Oitenta e um isolados bacterianos foram obtidos, sendo 26 de plantas de milho, 22 de braquiária, 11 de tomate, 8 de crotalaria, 7 de pimentão, 5 de trigo e 2 de cravo de defunto.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) – Ricardo Magela de Souza – UFLA.

ABSTRACT

NAVES, Rosemeire de Lellis. Isolation of endophytic bacteria of the root system of different plant species. In _____ Endophytic bacteria of the root system isolation and potencial for the biological control of plant parasitic nematodes. Lavras: UFLA, 2000. cap 2, p.42-62 (Thesis – Doctorate in Crop Science).*

Root system of different plant species, such as brachiaria (*Brachiaria* sp.), Crotalaria (*Crotalaria* sp), corn (*Zea mays* L.), sweet pepper (*Capsicum annum* L.), marigold (*Tagetes erecta* L.) tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and wheat (*Triticum aestivum* L.), were collected from Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci and Alfenas towns in Minas Gerais state, Brazil. Selected healthy roots were surface desinfestated with 50% alcohol and 1% sodium hypochloride, followed by three washings in 0,02 M sterelized potassium phosphate buffer solution (PB) (pH 7.0) after each disinfestation. The roots were, then, placed in ultrasound bath for 10 minutes to continue the desinfestation of the remaining epiphytic bacteria. The roots were cut and ground with sterelized pestle and mortar in PB solution. The ground roots were again placed in an ultasound bath for 10 minutos to improve the homogenization the roots suspension releasing the bacterium cells. The suspension was, then, diluted by 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} with buffer and plated in tryptic soy agar (TSA) medium. To check for the efficiency of the surface desinfestation, the washed PB was plated in TSA medium. When no bacterium growth was found within 48 hours, the isolates obtained were considered endophytic. Eighty one bacterial isolates were obtained, 26 of them from corn (26), 22 of brachiaria, 11 of tomato, 8 of chrotalaria, 7 of sweet pepper, 5 of wheat and 2 of marigold.

* Guidance Comittee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) – Ricardo Magela de Souza– UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti (1926), citado por Hallmann et al. (1997). Desde 1940 há inúmeros relatos de bactérias endofíticas nativas em vários tecidos de plantas, incluindo sementes e óvulos (Mundt e Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet e Hollis, 1948), raízes (Philipson e Blair, 1957), caules e folhas (Henning e Willforth, 1940, citados por Hallmann et al., 1997) e frutos (Samish Etinger-Tulczynska e Bick, 1961). Bactérias isoladas de tecidos internos de plantas sadias compreendem, até o momento, aproximadamente 129 espécies, representando cerca de 54 gêneros (Mundt e Hinkle, 1976; Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; McInroy e Kloepper, 1995; Sturz, 1995; Hallmann et al., 1997; com predominância dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium*. Os primeiros relatos consideravam bactérias endofíticas como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou patógenos latentes (Hollis, 1951; Thomas e Graham, 1952). Contudo, pesquisas mais recentes têm demonstrado que bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta e reduzir sintomas causados por diversos fitopatógenos (Van Peer e Schippers, 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Kloepper, Wei e Tuzun, 1992; Pleban, Ingel e Chet, 1995). Da mesma forma, a baixa tolerância ao estresse de plantas axênicas é, às vezes, parcialmente atribuída à ausência de microrganismos endofíticos (Hallmann et al., 1997).

A metodologia utilizada é extremamente importante e limitante nas investigações de bactérias endofíticas. Os procedimentos mais comuns para isolamento de bactérias endofíticas têm sido baseados na trituração de tecidos de plantas desinfestados superficialmente usando várias substâncias (Hollis, 1951; Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; Gagné et al., 1987; Caetano-Anollés, Favelukes e Bauer, 1990; Misaghi e Donndelinger, 1990; Fisher, Petrini e Scott,

1992; Sriskandarajah et al., 1993; Dong et al., 1994; McInroy e Kloepper, 1994; Hinton e Bacon, 1995; Pleban, Ingel e Chet, 1995; Quadt-Hallmann, Benhamou e Kloepper, 1997; Quadt-Hallmann, Hallmann e Kloepper, 1997;), seguida por diversas lavagens em água ou soluções tampões esterilizadas.

Para garantir a eficácia da desinfestação superficial, outras etapas foram acrescentadas ao processo, como o emprego do ultra-som, que tem se mostrado eficiente no processo de extração e isolamento de bactérias endofíticas (Mariano et al., 1997; Assis et al., 1998). Outra adaptação da técnica de desinfestação superficial envolve a aplicação de gotas de etanol no tecido da planta e flambagem da superfície (Dong et al., 1994).

Para isolar bactérias do xilema, têm sido empregadas bombas de vácuo (Gardner, Feldman e Zablutowicz, 1982; Bell et al., 1995) e a bomba de pressão Scholander (Hallmann, Kloepper e Rodríguez-Kábana, 1997). Também tem sido utilizada a centrifugação para isolar bactérias endofíticas de espaços intercelulares e intracelulares (De Wilt e Spickman, 1982).

No Brasil, alguns trabalhos têm sido realizados visando o isolamento de bactérias endofíticas de tecidos sadios de plantas, como repolho (Assis et al., 1998) e *Ipomea* sp. (Nascimento, 1998), para verificar o potencial antagônico desses organismos a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Assis et al., 1998) e a *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Nascimento, 1998). No entanto, a relação das bactérias endofíticas com fitonematóides ainda não foi investigada.

O objetivo desse trabalho foi isolar bactérias endofíticas a partir de sistemas radiculares sadios de diferentes espécies de plantas visando a realização de estudos de interação desses organismos com fitonematóides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e locais de coleta de raízes de plantas.

Amostras de raízes de diversas espécies de plantas foram coletadas de diferentes localidades nos municípios de Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci e Alfenas, no estado de Minas Gerais (TABELA 1). Em cada localidade amostrada foram coletadas três plantas por hectare, distribuídas uniformemente na área, dando-se preferência para plantas aparentemente saudáveis e cujo sistema radicular não apresentava galhas causadas por fitonematóides.

TABELA 1. Locais de coleta de amostras de raízes e os hospedeiros amostrados.
UFLA, Lavras – MG, 2000.

PLANTA AMOSTRADA	LOCAIS DE COLETA
Braquiária (<i>Brachiaria</i> sp. L.)	Lavras, Alfenas
Crotalária (<i>Crotalaria</i> sp. L.)	Lavras
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	Lavras, Ribeirão Vermelho
Pimentão (<i>Capsicum annum</i> L.)	Lavras, Ijaci
Cravo de defunto (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Lavras
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Lavras, Ribeirão Vermelho, Ijaci
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Lavras

No campo, após serem coletadas, as raízes foram envolvidas em papel toalha umidecido, acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas e transportadas ao laboratório.

2.2 Isolamento de bactérias endofíticas do sistema radicular.

As raízes sadias foram cuidadosamente lavadas em água de torneira para eliminar o solo aderido a elas, transferidas para frascos contendo solução tampão fosfato-potássio (PB) 0,02M esterilizada (pH 7,0) e submetidas a agitação vigorosa em agitador orbital por 1 hora, sendo essa operação repetida 4 vezes, após troca da solução PB. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a desinfestação superficial das raízes com álcool 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, seguida de 3 lavagens de 1 minuto em solução PB. Para desalojar da superfície bactérias epifíticas remanescentes, as raízes foram, então, transferidas para frascos contendo solução PB esterilizada e submetidas a banho de ultra-som por 10 minutos. Nova desinfestação superficial das raízes foi feita com hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos seguida de 3 lavagens em solução PB esterilizada. A seguir, as raízes foram novamente transferidas para frascos contendo solução PB esterilizada e submetidas a um banho de ultra-som por 10 minutos. A trituração das raízes foi feita em almofariz e pistilo esterilizados contendo PB e o triturado foi submetido a um banho de ultra-som por 10 minutos para desagregação das partículas e células bacterianas. Procedeu-se a homogeneização do triturado e posterior diluição em série em solução PB com fator de diluição 1:10. Retiraram-se, então, alíquotas de 100 µl das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , que foram transferidas para placas de Petri contendo meio 'tryptic soy agar' (TSA - Difco) e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. Foram preparadas cinco placas para cada diluição, que foram mantidas a 28 °C durante 48 horas em câmara de

crescimento. Após esse tempo, as colônias bacterianas apresentando características morfológicas diferentes dentro de uma mesma amostra, foram repicadas em meio TSA pelo método de estrias em "T", visando a obtenção de colônias isoladas. Posteriormente foram transferidas para tubos de ensaio com meio TSA inclinado e conservadas em câmara fria a 10 °C, sendo realizadas repicagens periódicas.

Para verificar a eficiência da desinfestação superficial das raízes, após cada banho de ultra-som, como controle, alíquotas de 100µl da solução de PB utilizada para aquela operação foram transferidas para placas de Petri contendo meio TSA, que foram incubadas nas mesmas condições descritas para as placas preparadas com as diluições dos triturados. Não havendo crescimento bacteriano nessas placas dentro de 48 horas, os isolados obtidos pela trituração das raízes foram considerados endofíticos.

2.3 Manutenção dos isolados bacterianos obtidos.

Objetivando a preservação dos isolados por um maior período de tempo, esses foram repicados para meio líquido peptona-glicerol, no qual permaneceram por 18 horas sob agitação constante a 28 °C. Após esse período, foram transferidos para tubos Eppendorff e mantidos em "freezer" a -80 °C.

2.4 Caracterização dos isolados obtidos.

Visando caracterizar parcialmente os isolados de bactérias endofíticas, foram realizados os testes de coloração de Gram e produção de pigmentos fluorescentes em meio King B (Schaad, 1988).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de bactéria endofíticas a partir dos sistemas radiculares de plantas.

Foram obtidos 81 isolados de bactérias endofíticas a partir dos sistemas radiculares sem sintomas de doenças das diferentes plantas amostradas (TABELA 2), demonstrando a eficácia da técnica empregada, a qual permitiu o isolamento de bactérias que ocorrem em diversos nichos, como o xilema, espaços inter e intracelulares. De fato, o emprego da desinfestação superficial e banho de ultra-som têm sido utilizado com sucesso para isolamento de bactérias epifíticas da superfície de frutos (Janisiewicz, 1988; Melo et al., 1995), bem como para o isolamento de endofíticas (Assis et al., 1996; Assis et al., 1998). Vários trabalhos também têm demonstrado a ocorrência de bactérias endofíticas em diversas partes de plantas, tais como sementes e óvulos (Mundt e Hinkle, 1976), tubérculos (Tervet e Hollis, 1948), raízes (Philipson e Blair, 1957) caules e folhas (Henning e Willforth, 1940, citados por Hallmann et al., 1997) e frutos (Samish, Ettinger-Tulczynska e Bick, 1961).

O número de isolados bacterianos obtidos foi diferenciado para cada espécie de planta amostrada (TABELA 2). Maior número de isolados foi obtido a partir do sistema radicular de plantas de milho e braquiária. De fato, a partir de raízes de milho tem sido obtido grande número de isolados de várias espécies de bactérias endofíticas como *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., além de outras espécies não identificadas (McInroy e Kloepper, 1995). Além disso, bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Azospirillum* têm sido isoladas a partir de raízes desinfestadas superficialmente de várias espécies de gramíneas como milho, sorgo e "kallar grass" (Patriquin e Dobereiner, 1978;

Schank et al., 1979; Umali-Garcia et al., 1980; Baldani et al., 1986; Reinhold-Hurek et al., 1993).

Pequeno número de tipos morfológicos foi obtido a partir de raízes de plantas de cravo de defunto e plantas de trigo, apesar de grande número de colônias desses tipos morfológicos terem sido observadas nas placas de Petri em que foram realizados os isolamentos. Trabalhando com rizobactérias, Coimbra (1998) também obteve apenas 4 isolados a partir de plantas de cravo de defunto.

A partir de raízes de tomateiro, foram obtidos onze isolados de bactérias endofíticas, número intermediário quando comparado aos obtidos a partir de outras espécies de plantas, contrastando com resultados relatados por Coimbra (1998), que obteve 37 isolados de rizobactérias a partir dessa espécie de planta. No entanto, a metodologia de isolamento utilizada por aquele autor não incluía desinfestação superficial das raízes trituradas, sendo isoladas também bactérias da rizosfera e do rizoplano. Por outro lado, o número de isolados obtidos a partir de raízes de plantas de pimentão se aproxima dos resultados relatados por Coimbra (1998), que obteve 9 isolados de rizobactérias a partir dessa planta.

TABELA 2. Número e códigos dos isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir do sistema radicular das diferentes plantas amostradas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

PLANTA AMOSTRADA	NÚMERO DE	
	ISOLADOS	CÓDIGOS DOS ISOLADOS
	OBTIDOS	
Braquiária (<i>Brachiaria</i> sp.)	22	BRA1, BRA2, BRA3, BRA4, BRA5, BRA6, BRA7, BRA8, BRA9, BRA10, BRA11, BRA12, BRA13, BRA14, BRA15, BRA16, BRA17, BRA18, BRA19, BRA20, BRA21, BRA22
Crotalária (<i>Crotalaria</i> sp.)	08	CRO1, CRO2, CRO3, CRO4, CRO5, CRO6, CRO7, CRO8
Milho (<i>Zea mays</i>)	26	MIL1, MIL2, MIL3, MIL4, MIL5, MIL6, MIL7, MIL8, MIL9, MIL10, MIL11, MIL12, MIL13, MIL14, MIL15, MIL16, MIL17, MIL18, MIL19, MIL20, MIL21, MIL22, MIL23, MIL24, MIL25, MIL26
Pimentão (<i>Capsicum annum</i> L.)	07	PIM1, PIM2, PIM3, PIM4, PIM5, PIM6, PIM7
Cravo de defunto (<i>Tagetes erecta</i> L.)	02	TAG1, TAG2
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	11	TOM1, TOM2, TOM3, TOM4, TOM5, TOM6, TOM7, TOM8, TOM9, TOM10, TOM11
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	05	TRI1, TRI2, TRI3, TRI4, TRI5
TOTAL	81	

3.2 Caracterização dos isolados bacterianos.

Dos oitenta e um isolados obtidos, quarenta e oito são Gram negativos (59,26%) e trinta e três Gram positivos (40,74%). Em geral, entre as bactérias endofíticas, espécies Gram negativas são consideradas dominantes quando comparadas com as Gram positivas, contabilizando 78% dos isolados do xilema de videira (Bell et al., 1995), 84% do xilema de raízes de citros (Gardner et al., 1982), 94% de raízes de alfafa (Gagné et al., 1987) e 75% de tecidos de milho e algodoeiro (McInroy e Kloepper, 1994). Por outro lado, Lalande et al., (1989) encontraram 88% de bactérias Gram positivas em raízes de plantas de milho com 2 meses de idade e Leifert, Waites e Nicholas (1989) relataram uma média de 70% de bactérias Gram positivas de nove espécies de plantas micropropagadas depois de 12 meses.

Dentre os isolados Gram negativos, dezoito (37,50%) produziram pigmentos fluorescentes em meio King B, podendo ser indicativo de *Pseudomonas fluorescens*. De fato, de acordo com Hallmann et al. (1997), os gêneros de bactérias endofíticas isolados com maior frequência são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium*, sendo que o maior número das espécies de *Pseudomonas* refere-se às do grupo fluorescente (Luz, 1996).

TABELA 3. Características apresentadas pelos isolados de bactérias endofíticas quando submetidos aos testes de coloração de Gram e de produção de pigmentos fluorescentes em meio King B. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Nº DE ORDEM	CÓDIGO DO ISOLADO	GRAM	FLUORESCENCIA EM MEIO KING B
01	MIL 1	-	-
02	MIL 2	-	-
03	MIL 3	+	-
04	MIL 4	-	-
05	MIL 5	+	-
06	MIL 6	-	-
07	MIL 7	+	-
08	MIL 8	-	-
09	MIL 9	+	-
10	MIL 10	+	-
11	MIL 11	+	-
12	MIL 12	-	-
13	MIL 13	-	-
14	MIL 14	-	-
15	MIL 15	+	-
16	MIL 16	+	-
17	MIL 17	-	-
18	MIL 18	+	-
19	MIL 19	+	-
20	MIL 20	-	+
21	MIL 21	+	-
22	MIL 22	-	-

“continua.....”

TABELA 3 (continuação)

23	MIL 23	+	-
24	MIL 24	+	-
25	MIL 25	+	-
26	MIL 26	+	-
27	BRA 1	+	-
28	BRA 2	-	-
29	BRA 3	+	-
30	BRA 4	-	+
31	BRA 5	-	+
32	BRA 6	-	-
33	BRA 7	-	+
34	BRA 8	-	-
35	BRA 9	-	+
36	BRA 10	-	+
37	BRA 11	-	-
38	BRA 12	+	-
39	BRA 13	-	+
40	BRA 14	-	-
41	BRA 15	+	-
42	BRA 16	-	+
43	BRA 17	+	-
44	BRA 18	+	-
45	BRA 19	-	-
46	BRA 20	-	+
47	BRA 21	-	-
48	BRA 22	+	-
49	TOM 1	-	-
50	TOM 2	-	-

“.....continua.....”

TABELA 3 (continuação)

51	TOM 3	-	-
52	TOM 4	+	-
53	TOM 5	+	-
54	TOM 6	-	-
55	TOM 7	-	-
56	TOM 8	-	-
57	TOM 9	+	-
58	TOM 10	+	-
59	TOM 11	-	-
60	CRO 1	-	-
61	CRO 2	-	-
62	CRO 3	+	-
63	CRO 4	+	-
64	CRO 5	-	+
65	CRO 6	+	-
66	CRO 7	-	-
67	CRO 8	-	+
68	PIM 1	-	-
69	PIM 2	-	+
70	PIM 3	+	-
71	PIM 4	-	+
72	PIM 5	-	-
73	PIM 6	-	+
74	PIM 7	+	-
75	TRI 1	-	+
76	TRI 2	-	+
77	TRI 3	-	+

“.....continua.....”

TABELA 3 (continuação)

78	TRI 4	-	+
79	TRI 5	+	-
80	TAG 1	-	-
81	TAG 2	+	-

4 CONCLUSÕES

- 1- Bactérias endofíticas estão associadas aos sistemas radiculares de plantas sem sintomas de doenças.
- 2- Foram obtidos 81 isolados de bactérias endofíticas, sendo 22 a partir do sistema radicular de plantas de braquiária (*Brachiaria* sp.), 8 de crotalária (*Crotalaria* sp.), 26 de milho (*Zea mays*), 7 de pimentão (*Capsicum annum* L.), 2 de cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), 11 de tomateiro (*Lycopersicon esculatum* Mill.) e 5 de trigo (*Triticum aestivum* L.).
- 3- Nos locais em que foram realizadas as coletas e nas plantas amostradas, as bactérias endofíticas predominaram qualitativamente nas raízes de gramíneas.
- 4- Nos locais em que foram realizadas as coletas e nas plantas amostradas, as bactérias endofíticas Gram negativas predominaram qualitativamente em relação às bactérias Gram positivas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; COELHO, R.S.B. Biocontrol on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R.J.; ROVIRA, A. (eds) *Advances in biological control of plant diseases*. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p.347-353.
- ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p. 216-220, July/Dez. 1998.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. *Intenational Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.36, n.1, p. 86-93, Jan. 1986.
- BELL, C.R.; DICKIE, G.A. ; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.41, n.1, p.46-53, Jan. 1995.
- CAETANO-ANNOLÉS, G.; FAVELUKES, G.; BAUER, W.D. Optimization of surface of legume seed. *Crop Science*, Madison, v.30, n.3, p. 708-712, May/June, 1990.
- COIMBRA, J.L. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* sp. Lavras; UFLA, 1998. 75p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).
- DE WILT, P.J.G.M.; SPICKMAN, G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiological Plant Pathology*, Washington, v.21, n.1, p.1-11, Jan. 1982.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugar stems. *Plant Physiology*, Baltimore, v.105, n.4, p.1139-1147, Aug. 1994.

- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SCOTT, L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize. *Phytopathology*, Cambridge, v.122, n.2, p.299-305, Feb. 1992.
- FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, n.3, p.928-936, July 1991.
- GAGNÉ, S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfafa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.33, n.11, p.996-1000, Nov. 1987.
- GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWSCZ, R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon root of Florida citrus trees. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 43, n. 6, p. 1335-1342, June 1982.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Application of the scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, n. 5, p.411-416, May 1997.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A. ; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.10, p.895-914, Oct. 1997.
- HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, Amsterdam, v. 129, n.1, p.117-125, Jan. 1995.
- HOLLIS, J. P. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, Lancaster, v. 41, n.4, p.351-366, Apr. 1951.
- JANISIEWICZ, W.J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixture. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n.2, p.194-198, Feb. 1988.

- KLOEPPER, J.W.; WEI, G.; TUZUN, S. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: TJAMOS, E.S. (ed) **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p.185-191.
- LALANDE, R. ; BISSONNETTE, N.; COUTLÉE, ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, n.1, p. 7-11, Jan. 1989.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M.; NICHOLAS, J.R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. **Journal Applied of Bacteriology**, New York, v.67, n.3, p.353-361, May/June 1989.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 4, p. 1-49, 1996.
- MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; MELLO, M.R.F.; MOURA, F.F.; ANDRADE, A.Q.V.; SILVA,G. Método de isolamento de bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.235, Ago 1997. Suplemnto.
- MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: O'GARA, D.N. (ed) **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1994. p. 19-28.
- MCINROY, J.A. ; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, n.2, p.337-342, June 1995.
- MELO, R.A.G.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF,S.J.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Controle biológico da podridão mole do pimentão (*Capsicum annun* L.) causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, n.3/4, p.206-212, jul./dez. 1995.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 9, p. 808-811, Sept. 1990.

- MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 32, n.4, p. 694-698, Apr. 1976.
- NASCIMENTO, A. S. Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibater michiganensis* subsp. *michiganensis* e tomateiro. Brasília: UnB, 1998.91p (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)
- PATRIQUIN, D.; DOBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.24, n.10, p.734-742, Oct. 1978.
- PHILIPSON, M.N.; BLAIR, I.D. Bacteria in clover root tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.3, n.1, p. 125-129, Jan. 1957.
- PLEBAN, S.; INGEL, F; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, London, v. 101, n.3, p. 665-672, May/June 1995.
- QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.6, p.577-582, June 1997.
- QUADT-HALLMANN, A. ; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.3, p.254-259, 1997.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOST, B. VACANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov., and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology*, Washington, v.43, n.5, p.574-584, May 1993.
- SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. Microflora within heathy tomatoes. *Applied Microbiology*, Washington, v.9, n.1, p. 20-25, Jan. 1961.
- SCHAAD, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1988. 158p.

- SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; WEISER, G.C.; ZUBERER, D. A. ; BOUTON, J.H.; QUESENBERRY, K.H.; TYLER, M.E.; MILAM, J.R.; LITTELL, R.C. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil Biological and Biochemistry*, Oxford, v.11, n.3, p.287-295, Mar. 1979.
- SRISKANDARAJAH, S.; KENNEDY, I.R.; YU, D; TCHAN, Y.T. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 153, n.2, p.165-178, Jun 1993.
- STURZ, A .V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.175,n.2, p. 257-263, Aug. 1995.
- TERVET, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in storage organs healthy plants. *Phytopatology*, Madison, v.38, n.1, p.157-165, Jan. 1948.
- THOMAS JR., D.; GRAHAM, R.W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathology*, Madison, v.42, n.2, p.214, Feb. 1952.
- UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D.H.; GASKINS, M.H.; DAZZO, F.B. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.39, n.1, p. 219-226, Jan. 1980.
- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with seleted *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 35, n.1, p. 456-463, Jan. 1989.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE FILTRADOS DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA MOTILIDADE, MORTALIDADE E ECLOSÃO DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne javanica*.

RESUMO

NAVES, Rosemeire de Lellis. Efeito de filtrados de isolados de bactérias endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. In: _____. Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides. Lavras: UFLA, 2000. cap.3. p.63 -83. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).*

Testaram-se os efeitos dos filtrados das culturas de 40 isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne javanica*. Para obtenção dos filtrados, as bactérias foram cultivadas em meio líquido “tryptic soy broth” (TSB) por 7 dias a 28 °C sob agitação constante a 100 rpm, centrifugadas a 10.000g por 15 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro Millipore de 0,22 μ m de abertura de poro. Cerca de 100 ovos ou 100 J_2 foram colocados em cada filtrado bacteriano para os ensaios de motilidade, mortalidade e eclosão, respectivamente. As avaliações foram feitas após 24 e 48 horas para motilidade e mortalidade e após 15 dias para a eclosão de juvenis. Dos isolados testados, sete imobilizaram os juvenis em 24 horas, não ocorrendo recuperação da mobilidade após serem transferidos para água, provocando, dessa forma, porcentagens de mortalidade semelhantes à provocada pelo nematocida aldicarbe utilizado como controle. Os mesmos isolados também inibiram eficientemente a eclosão dos juvenis. Dois isolados provocaram a morte de mais de 90% dos juvenis somente após 48 horas de exposição. Diferentes diluições dos filtrados dos 8 isolados mais eficientes também foram testadas. Maiores índices de mortalidade e redução na eclosão foram provocados pelas diluições 1:0 e 1:1 (v/v) (filtrado:água).

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) - Ricardo Magela de Souza - UFLA. (Co-Orientador)

ABSTRACT

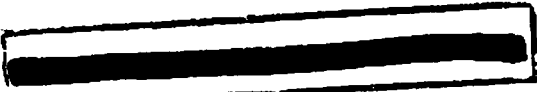
NAVES, Rosemeire de Lellis. Effect of isolates on motility, mortality and hatching of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* In:
Endophytic bacteria of the root system: isolation and potential on the biological control of plant parasitic nematodes. Lavras: UFLA, 2000. Cap.3, p.63-83. (Doctorate Thesis in Crop Science).*

Filtrates of 40 isolates of endophytic bacteria from the root system of different plant species on the motility, mortality and hatching of second stage juveniles (J_2) of *Meloidogyne javanica* were tested. For obtaining the filtrates, bacteria were cultivated in liquid tryptic soy broth (TSB) medium for seven days at 28°C under constant stirring at 100 rpm, centrifugalized at 10,000 G for 15 minutes. The supernatant was filtrated in Millipore filter of 0,22 μm of pore opening. The evaluations were done 24 and 48 hours later by counting the numbers of nonmotile nematodes and dead. Hatched J_2 were counted 15 days after setting up the experiment. Seven bacterial isolates immobilized the juveniles in 24 hours of exposure, but the movement was not recovered when placed in water. This effect was similar to aldicarb treatment used as control. These isolates inhibited hatching, as well. Two isolates killed more than 90% of the J_2 after 48 hours exposure. Dilutions of the filtrates were tested using the best isolates based on reduction of hatching, increased mortality e inhibition of motility. Dilutions of 1:0 and 1:1 (bacterial filtrate: water) greatly reduced hatch, increased mortality and inhibited movement of J_2 .

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) – Ricardo Magela de Souza – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias no controle biológico de fitonematóides tem recebido atenção apenas nas últimas décadas, sendo enfatizadas as bactérias parasitas do gênero *Pasteuria* e as rizobactérias (Campos, Souza e Souza, 1998). O modo de ação desses organismos sobre os nematóides tem sido enfatizado em alguns trabalhos (Jonhston, 1959; Sayre, 1980; Sikora e Hoffmann-Hergaten, 1996; Quadt-Hallmann et al., 1996). Bactérias, como algumas espécies dos gêneros *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, já demonstraram a capacidade de produzir substâncias tóxicas aos nematóides (Jonhston, 1959; Lizuka et al., 1962; Rodríguez-Kábana, Jordan e Hollis, 1965; Wilt e Smith, 1970; Ignoffo e Dropkin, 1977; Jacq e Fortuner, 1979). O efeito nematicida e nematostático de filtrados de culturas bacterianas foi inicialmente demonstrado por Lizuka et al. (1962) trabalhando com 134 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, dos quais 69 apresentaram intensa atividade nematicida contra *Meloidogyne* sp. Os mesmos autores demonstraram que filtrados de cultura de 9 isolados de *Enterobacter* apresentaram alta atividade nematicida. Filtrados de cultura de *Bacillus cereus* crescida em meio 'tryptic soy broth' (TSB) mostraram atividade nematicida a J₂ e ovos de *Meloidogyne javanica* (Oka, Chet e Spiegel, 1993). Carneiro, Souza e Belarmino (1998) testaram vinte e um isolados de *Bacillus* spp. em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em ensaios *in vitro*. A cultura total e o sobrenadante de *B. thuringiensis brasiliensis* e *B. lateosporus* mataram J₂ recém eclodidos após 24 e 48 horas, enquanto *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis morrisoni* e *B. circulans* causaram apenas imobilização ou redução de movimento. Vários modos de ação têm sido preconizados para explicar a ação antagonística de bactérias a nematóides (Kloepper et al., 1980; Neilands, 1981; Van Peer e Schippers, 1989).



As bactérias até então estudadas na produção de substâncias tóxicas a fitonematóides tem sido rizobactérias, bactérias livres do solo ou do filoplano. O estudo das bactérias endofíticas nesse aspecto merece atenção, uma vez que esses organismos, devido a sua capacidade de viver no interior dos tecidos da planta, escapam da competição com outros microrganismos do solo (Misaghi e Donndelinger, 1990), podendo estar melhor adaptados a sobreviver nesse ambiente competitivo, beneficiando-se do catabolismo de metabólitos de plantas (McInroy e Kloepper, 1995). Nenhuma pesquisa tem sido desenvolvida sobre o antagonismo de bactérias endofíticas aos nematóides no Brasil.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar, *in vitro*, o efeito dos metabólitos produzidos por bactérias endofíticas isoladas a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas, como braquiária (*Brachiaria* sp. L.), crotalária (*Crotalaria* sp. L.), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e trigo (*Triticum aestivum* L.) na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, 1949.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta isolados de bactérias endofíticas de sistemas radiculares de plantas de braquiária, crotalária, milho, tomate e trigo obtidos em trabalhos anteriores, foram utilizados para produção dos filtrados.

2.1 Preparo dos filtrados de cultura de bactérias endofíticas.

Os isolados de bactérias endofíticas preservados em meio líquido peptona-glicerol em "freezer", a -80°C , foram transferidos para placas de Petri contendo meio 'tryptic soy agar' (TSA) e incubados a 28°C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, pequena porção do crescimento bacteriano, com auxílio de alça de platina, foi repicada para frascos de vidro contendo 100 ml de meio líquido "tryptic soy broth" (TSB), que foram mantidos a 28°C por 7 dias em agitador orbital, sob agitação de 100 rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos para remoção das células bacterianas e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore com $0,22\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro.

2.2 Obtenção de ovos de *Meloidogyne javanica*.

Ovos de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, foram extraídos de raízes de tomateiro 'Santa Clara' mantidas em casa-de-vegetação através da técnica proposta por Hussey e Barker (1973). Para tanto, raízes de tomateiro com galhas foram cuidadosamente lavadas com água de torneira em bandeja e, em seguida, cortadas em pedaços de 0,5cm de comprimento e trituradas em liquidificador com 200ml de hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras

de 0,075mm sobre 0,038mm de abertura. O material retido na peneira de 0,038mm foi coletado num becker com auxílio de piseta com água, completando-se todo o processo em 2 minutos.

2.3 Obtenção de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

Para obtenção de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*, a suspensão de ovos, obtida conforme descrito em 2.2, foi colocada em câmaras de eclosão preparadas em placas de Petri de 10cm de diâmetro. Uma tela plástica fina foi colocada no fundo da placa e coberta com papel extra-fino em folhas duplas. A cada placa foram adicionados 25ml de suspensão de ovos e, após 24 horas, foram coletadas as suspensões J₂.

2.4 Efeito do filtrado de culturas de bactérias endofíticas na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

Para avaliar o efeito do filtrado de culturas de bactérias endofíticas na motilidade e mortalidade de J₂, 0,6ml de cada filtrado, obtido conforme descrito em 2.1, foi colocado em lâminas escavadas esterilizadas, para onde foram transferidos cerca de 100 J₂ de *Meloidogyne javanica* recém eclodidos, previamente tratados com sulfato de estreptomicina 0,1% por cinco minutos e lavados em água destilada esterilizada. As lâminas foram transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e mantidas em condições de laboratório a 25 ±2°C. Foram feitas 8 repetições para cada tratamento e as testemunhas foram água destilada esterilizada, meio TSB sem crescimento bacteriano e aldicarbe a 50ppm. Após 24 e 48 horas avaliaram-se, com auxílio de microscópio estereoscópio, as porcentagens de J₂ imobilizados e mortos,

utilizando-se 4 repetições a cada período de avaliação. Foram considerados mortos os nematóides que, 24 horas após terem sido retirados do filtrado e transferidos para água, não recuperaram a mobilidade. Foram montados dois ensaios, sendo utilizados 20 isolados em cada um.

2.5 Efeito do filtrado de culturas de bactérias endofíticas na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

Para avaliar o efeito do filtrado de culturas de bactérias endofíticas na eclosão de J₂, 5ml de cada filtrado, obtido conforme descrito em 2.1, foram colocados em placas de Petri de 4cm de diâmetro esterilizadas, para onde foram transferidos cerca de 100 ovos de *Meloidogyne javanica*, previamente tratados com sulfato de estreptomicina 0,1% por cinco minutos e lavados em água destilada esterilizada. As placas foram mantidas em condições de laboratório a 25 ±2°C. Após 15 dias avaliou-se, com auxílio de microscópio estereoscópio, a porcentagem de J₂ eclodidos. Foram feitas 5 repetições para cada tratamento, sendo utilizados como testemunhas água destilada esterilizada, meio TSB sem crescimento bacteriano e aldicarbe a 50ppm. Foram montados dois ensaios, sendo utilizados 20 isolados em cada um.

2.6 Efeito de diferentes diluições dos filtrados de culturas de bactérias endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

Para avaliar o efeito de diferentes diluições dos filtrados sobre *M. javanica* selecionaram-se oito isolados que se mostraram mais eficientes na redução da motilidade e eclosão e aumento da mortalidade de J₂ de *Meloidogyne javanica*. Para tanto, os filtrados das culturas bacterianas foram diluídos em água

destilada esterilizada nas proporções de 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v) (filtrado:água) e os ensaios montados conforme descrito em 2.4 e 2.5.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística.

Os ensaios foram montados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram transformados em $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos a análise de variância. As médias de cada tratamento nos dois primeiros ensaios foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (Scott e Knott, 1974) ao nível de 5% de significância. No ensaio em que foi testado o efeito de diferentes diluições dos filtrados bacterianos, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 8 x 4 e as médias foram agrupadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito *in vitro* de filtrados dos isolados de bactérias endofíticas utilizados nos ensaios na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*.

A porcentagem de J₂ imóveis após 24 horas foi muito baixa, não diferindo das testemunhas água e TSB, em apenas três filtrados bacterianos, no primeiro ensaio (TABELA 1). No segundo ensaio, todos os filtrados tiveram mais juvenis imóveis do que as testemunhas água e TSB (TABELA 2). Após 48 horas esses valores variaram. No primeiro ensaio, filtrados de sete isolados não diferiram das testemunhas (água e TSB). No segundo ensaio, novamente, todos os filtrados tiveram mais juvenis imóveis do que as testemunhas (água e TSB).

Cinco filtrados de isolados bacterianos no primeiro ensaio e dois no segundo proporcionaram porcentagens de J₂ imóveis acima de 85%, tanto em 24 quanto em 48 horas de exposição, aproximando-se da testemunha aldicarbe.

Observa-se, portanto, que a maioria dos isolados bacterianos produz *in vitro* substâncias que afetam a motilidade de *M. javanica* e que tais substâncias podem ser diferentes ou sere produzidas em quantidades elevadas em alguns isolados, causando, por conseguinte, efeito mais drástico na motilidade de J₂. Resultados semelhantes foram encontrados por Carneiro, Souza e Belarmino (1998), que trabalhando com isolados de *Bacillus*, observaram que *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis morrisoni* e *B. circulans* causaram imobilização ou redução de movimento em J₂ recém eclodidos de *M. javanica*.

TABELA 1. Porcentagens médias de juvenis de *Meloidogyne javanica* imóveis, mortos e eclodidos quando expostos aos filtrados das culturas dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	PERCENTAGEM DE JUVENIS IMÓVEIS		PERCENTAGEM DE JUVENIS MORTOS		PERCENTAGEM DE JUVENIS ECLODIDOS
	APOS 24	APOS 48	APOS 24	APOS 48	
	HORAS	HORAS	HORAS	HORAS	
TOM 1	2,50 f	4,75 e	2,00 h	4,75 e	89,60 b
CRO 1	0,25 g	4,50 e	0,25 i	4,50 e	95,20 c
TRI 1	4,25 d	66,5 b	33,75 e	66,50 b	95,00 c
TRI 2	0,00 g	1,50 e	0,00 i	1,50 e	89,40 b
MIL 1	90,50 b	98,50 a	90,50 b	98,50 a	10,40 a
MIL 2	4,50 f	11,25 d	3,75 h	11,25 d	93,20 c
MIL 3	3,25 f	4,75 e	3,00 h	4,75 e	94,20 c
MIL 4	93,25 b	96,25 a	93,25 b	96,25 a	14,20 a
MIL 5	91,50 b	95,75 a	91,50 b	95,75 a	9,20 a
MIL 6	1,00 g	5,75 e	1,00 i	5,75 e	91,00 b
MIL 9	3,75 f	4,25 e	2,75 h	4,25 e	91,00 b
MIL 10	54,25 c	78,50 b	54,25 d	74,10 b	93,00 c
MIL 11	36,50 d	76,25 b	36,50 e	76,25 b	92,80 c
MIL 12	7,00 e	10,00 d	7,00 g	9,25 d	90,80 b
MIL 14	2,25 f	5,00 e	2,25 h	5,00 e	93,20 b
MIL 16	90,00 b	96,25 a	75,00 c	96,25 a	12,20 a
MIL 17	5,25 f	10,25 d	5,25 g	10,25 d	82,20 b
MIL 19	52,00 e	72,00 b	52,00 e	70,00 b	88,80 b
MIL 20	12,00 c	39,00 c	12,00 f	39,00 c	91,40 b
MIL 21	85,25 b	95,00 a	85,25 c	95,00 a	8,80 a
ÁGUA	0,00 g	0,00 e	0,00 i	0,00 e	96,60 c
TSB	0,50 g	2,75 e	0,00 i	2,75 e	96,20 c
ALDICARBE	99,50 a	100,00 a	99,50 a	100,00 a	4,60 a

Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2. Porcentagens médias de juvenis de *Meloidogyne javanica* imóveis, mortos e eclodidos quando expostos aos filtrados das culturas dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	PERCENTAGEM DE JUVENIS IMÓVEIS		PERCENTAGEM DE JUVENIS MORTOS		PERCENTAGEM DE JUVENIS ECLODIDOS
	APOS 24 HORAS	APOS 48 HORAS	APOS 24 HORAS	APOS 48 HORAS	
BRA 2	32,25 e	56,75 c	32,25 b	56,75 c	90,40 c
BRA 4	11,75 f	29,75 d	11,75 c	29,75 d	91,80 c
BRA 5	85,25 c	98,25 a	85,25 a	98,25 a	9,00 a
BRA 6	5,25 g	24,00 e	4,25 c	24,00 e	87,20 c
BRA 8	2,75 g	13,50 e	2,75 c	13,50 e	85,80 c
BRA 9	2,25 g	27,00 d	2,25 c	27,00 d	89,20 c
BRA 10	3,00 g	16,75 e	3,00 c	16,75 e	91,80 c
BRA 11	2,50 g	58,50 c	2,75 c	58,50 c	76,80 c
BRA 12	4,00 g	18,25 e	4,00 c	18,25 e	89,40 c
BRA 13	13,75 f	64,25 c	12,00 c	56,75 c	90,40 c
BRA 14	2,25 g	37,75 d	2,25 c	37,75 d	90,80 c
BRA 15	94,50 b	98,25 a	94,50 a	98,75 a	20,00 b
BRA 17	12,00 f	64,75 c	12,00 c	64,75 c	89,00 c
BRA 18	34,50 e	60,50 c	34,50 b	60,50 c	91,40 c
BRA 19	55,00 d	93,50 b	55,00 b	93,50 b	89,60 c
BRA 20	67,25 d	98,75 a	67,25 b	98,75 a	88,00 c
MIL 7	64,25 d	99,25 a	64,25 b	99,25 a	12,00 a
MIL 8	43,25 e	60,00 c	43,25 b	60,00 c	28,40 b
MIL 13	41,25 e	66,75 c	41,25 b	66,75 c	92,80 c
MIL 15	13,25 d	39,50 d	10,75 c	39,50 d	84,40 c
ÁGUA	0,00 h	0,25 f	0,00 c	0,25 f	95,00 c
TSB	0,50 h	2,25 f	0,00 c	2,25 f	94,20 c
ALDICARBE	99,25 a	100,00 a	99,25 a	100,00 a	3,20 a

Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A porcentagem de J_2 mortos após 24 horas foi maior do que nas testemunhas (água e TSB) na maioria dos isolados no primeiro ensaio e em 45% dos isolados no segundo ensaio. Apenas três isolados no primeiro ensaio e onze no segundo não diferiram das testemunhas (água e TSB) (TABELAS 1 e 2). Após 48 horas a mortalidade aumentou em todos os isolados alterando os valores anteriormente comentados (TABELAS 1 e 2). Apenas sete isolados não diferiram das testemunhas (água e TSB) no primeiro ensaio. Já no segundo ensaio a mortalidade foi maior do que as testemunhas (água e TSB) em todos os filtrados testados (TABELAS 1 e 2).

No primeiro ensaio, os mesmos cinco isolados que mais afetaram a motilidade de J_2 discutidos anteriormente também mantiveram alta mortalidade de J_2 . No segundo ensaio, também os mesmos dois isolados que mais afetaram a motilidade continuaram causando as mais altas mortalidades. Entretanto, mais dois isolados no segundo ensaio também proporcionaram altas mortalidades, acima de 90%, quando expostos por 48 horas. Esses mesmos isolados proporcionaram taxa de mortalidade entre 60 e 70% quando expostos por 24 horas.

Parece, portanto, que as substâncias ou as dosagens mais elevadas delas que causam imobilidade, são as mesmas que causam mortalidade. Lizuka et al. (1962) também relataram que sessenta e nove isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentaram intensa atividade nematicida contra *Meloidogyne* sp. Os mesmos autores demonstraram que filtrados de cultura de 9 isolados de *Enterobacter* apresentaram alta atividade nematicida. Filtrados de cultura de *Bacillus cereus* crescida em meio 'tryptic soy broth' (TSB) mostraram atividade nematicida a J_2 de *Meloidogyne javanica* (Oka, Chet e Spiegel, 1993). Carneiro, Souza e Belarmino (1998) testaram vinte e um isolados de *Bacillus* spp. em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em ensaios *in vitro*. A

cultura total e o sobrenadante de *B. thuringiensis brasiliensis* e *B. lateosporus* mataram J₂ recém eclodidos após 24 e 48 horas.

A porcentagem de eclosão foi alta na maioria dos isolados testados, tanto no primeiro quanto no segundo ensaio. A eclosão de J₂ de *M. javanica* em seis e dezesseis isolados no primeiro e segundo ensaios, respectivamente, tiveram eclosão semelhante às testemunhas (água e TSB) (TABELAS 1 e 2). As mais baixas eclosões no primeiro ensaio provieram dos mesmos cinco isolados que afetaram grandemente a motilidade e causaram alta mortalidade. No segundo ensaio, os mesmos dois isolados que afetaram grandemente a motilidade e causaram alta mortalidade também proporcionaram alta inibição da eclosão. Entretanto, dos dois isolados que proporcionaram também alta mortalidade, após 48 horas, BRA 20 e MIL 7, com discutido anteriormente, apenas um deles, MIL 7, inibiu significativamente a eclosão de J₂ (TABELAS 1 e 2).

Novamente, parece que as substâncias ou suas dosagens que afetam a motilidade e provocam alta mortalidade, também inibem a eclosão, afetando, por conseguinte, os embriões dentro dos ovos. Resultados semelhantes foram obtidos por Oka, Chet e Spiegel (1993), que verificaram que filtrados de cultura de *Bacillus cereus* crescida em meio 'trypic soy broth' (TSB), mostraram atividade nematicida a ovos de *Meloidogyne javanica*.

A motilidade e mortalidade de J₂ como bioteste para substâncias produzidas *in vitro* por bactérias endofíticas parecem discernir melhor os isolados que produzem essas substâncias tóxicas quando a exposição do nematóide é de 24 horas apenas. A avaliação da eclosão de J₂ em presença de filtrados bacterianos ajuda a descartar isolados que, nos testes de motilidade e mortalidade, tiveram resultados intermediários. Observa-se que os filtrados obtidos dos isolados TRI 1 e MIL 19 propiciaram reduções crescentes na motilidade e mortalidade quando as exposições a esses filtrados variaram de 24

para 48 horas. Contudo, quando ovos foram colocados em câmara de eclosão com esses filtrados a eclosão foi ótima, acima de 88% (TABELAS 1 e 2). Desta forma, nos biotestes para selecionar filtrados bacterianos devem ser empregados os três testes concomitantemente.

3.2 Efeito de diferentes diluições dos filtrados de culturas de bactérias endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne javanica*.

Os oito isolados testados comportaram-se de forma semelhante quanto à motilidade de J_2 após 24 horas de exposição, não havendo diferença significativa entre eles pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (TABELA 3). No entanto, interação significativa foi observada entre as diluições dos filtrados e os isolados. Maiores porcentagens (acima de 90%) de juvenis imóveis foram observadas quando os filtrados foram utilizados sem diluição (1:0), havendo redução dessas porcentagens à medida que o filtrado foi diluído. De forma geral, diferenças significativas foram observadas entre as diluições de cada isolado. Apenas para o isolado MIL 21 não houve diferença significativa entre as diluições 1:2 e 1:3. Valores entre 41,50% e 55,00% de juvenis imóveis foram observados quando os filtrados foram diluídos na razão de 1:2. Contudo, esses valores caíram para até 1,25% nas diluições 1:3. Comportamento semelhante dos filtrados de cada isolado nas diferentes diluições foi observado para motilidade após 48 horas (TABELA 4) e mortalidade após 24 horas de exposição (TABELA 5).

Não foram observadas diferenças significativas entre os filtrados dos isolados nem interação entre os isolados e as diluições, quanto à mortalidade, após 48 horas de exposição (TABELA 6). No entanto, as porcentagens médias de juvenis mortos foram significativamente diferentes entre as diluições testadas.

Foram observados, em média, 96,91% , 87,94%, 67,56% e 5,35% de juvenis mortos nas diluições 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3, respectivamente.

TABELA 3. Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* imóveis após 24 horas de exposição às diferentes diluições dos filtrados de culturas de bactérias endofíticas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	DILUIÇÕES (FILTRADO:ÁGUA)				MÉDIA
	1:0	1:1	1:2	1:3	
MIL 1	90,25 a	78,75 b	52,50 c	5,25 d	56,69
MIL 4	93,75 a	69,00 b	52,25 c	4,25 d	55,56
MIL 5	93,25 a	81,75 b	47,00 c	2,25 d	56,06
MIL 16	91,00 a	77,00 b	44,50 c	2,00 d	53,62
MIL 21	83,75 a	76,75 b	41,50 c	6,75 c	52,19
BRA 5	88,00 a	76,50 b	52,50 c	4,00 d	55,25
BRA 15	96,00 a	77,75 b	52,50 c	1,25 d	56,88
MIL 7	96,50 a	78,00 b	55,00 c	1,25 d	57,69
MÉDIA	91,56	76,94	50,09	3,38	55,49

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

TABELA 4. Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* imóveis após 48 horas de exposição às diferentes diluições de filtrados de culturas de bactérias endofíticas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	DILUIÇÕES (FILTRADO:ÁGUA)				MÉDIA
	1:0	1:1	1:2	1:3	
MIL 1	98,00 a	90,25 b	67,50 c	7,75 d	65,88
MIL 4	98,00 a	82,50 b	69,00 c	6,25 d	63,94
MIL 5	97,75 a	88,50 b	68,75 c	2,75 d	64,50
MIL 16	94,75 a	87,00 b	66,75 c	4,50 d	63,25
MIL 21	95,00 a	89,25 b	61,25 c	10,25 c	63,94
BRA 5	96,50 a	88,75 b	72,00 c	7,50 d	66,19
BRA 15	98,00 a	88,50 b	67,50 c	4,00 d	64,50
MIL 7	98,00 a	90,25 b	68,25 c	0,75 d	64,31
MÉDIA	96,91	87,94	67,36	5,38	64,56

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

TABELA 5. Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* mortos após 24 horas de exposição às diferentes diluições de filtrados de culturas de bactérias endofíticas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	DILUIÇÕES (FILTRADO:ÁGUA)				MÉDIA
	1:0	1:1	1:2	1:3	
MIL 1	90,25 a	78,75 b	52,50 c	5,25 d	56,69
MIL 4	93,75 a	69,00 b	52,25 c	4,25 d	55,56
MIL 5	93,25 a	81,75 b	47,00 c	2,25 d	56,06
MIL 16	91,00 a	77,00 b	44,50 c	2,00 d	53,62
MIL 21	83,75 a	76,75 b	41,50 c	6,75 c	52,19
BRA 5	88,00 a	76,50 b	52,50 c	4,00 d	55,25
BRA 15	96,00 a	77,75 b	52,50 c	1,25 d	56,88
MIL 7	96,50 a	78,00 b	55,00 c	1,25 d	57,69
MÉDIA	91,56	76,94	50,09	3,38	55,49

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

TABELA 6. Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* mortos após 48 horas de exposição às diferentes diluições dos filtrados de culturas de bactérias endofíticas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	DILUIÇÕES (FILTRADO:ÁGUA)				MÉDIA
	1:0	1:1	1:2	1:3	
MIL 1	98,00	90,25	67,50	7,75	65,88
MIL 4	98,00	82,50	69,00	6,25	63,94
MIL 5	97,75	88,50	68,75	2,75	64,50
MIL 16	94,75	87,00	66,75	4,50	63,25
MIL 21	94,25	87,50	60,75	9,50	63,00
BRA 5	96,50	88,75	72,00	7,50	66,19
BRA 15	98,00	88,50	67,50	4,00	64,50
MIL 7	98,00	90,25	68,25	0,75	64,31
MÉDIA	96,91 a	87,94 b	67,56 c	5,38 d	64,45

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Interação significativa entre os isolados e as diferentes diluições testadas também foi observada nas porcentagens de juvenis eclodidos (TABELA 7). Maiores inibições na eclosão de juvenis foram observadas quando os ovos foram expostos à diluição de 1:0, seguida das diluições 1:1, 1:2 e 1:3, havendo diferenças significativas entre elas. Apenas para o isolado MIL 7 não foi observada diferença entre a diluição 1:1 e 1:2. Porcentagens de juvenis eclodidos de até 63,50%, foram observadas quando os ovos foram expostos à diluição de 1:2. No entanto, esses percentuais elevaram-se para até 89,90% quando os ovos foram expostos à diluição de 1:3.

TABELA 7. Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* eclodidos após 48 horas de exposição às diferentes diluições de filtrados de culturas de bactérias endofíticas. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	DILUIÇÕES (FILTRADO:ÁGUA)				MÉDIA
	1:0	1:1	1:2	1:3	
MIL 1	10,20 a	25,60 b	41,20 c	78,40 d	38,85
MIL 4	10,20 a	21,80 b	43,20 c	79,80 d	48,55
MIL 5	12,00 a	29,40 b	53,40 c	89,80 d	38,75
MIL 16	8,80 a	28,40 b	51,40 c	81,60 d	46,15
MIL 21	9,60 a	23,60 b	46,20 c	76,60 c	42,55
BRA 5	13,40 a	22,00 b	37,00 c	66,80 d	39,00
BRA 15	13,80 a	30,00 b	37,20 c	77,40 d	34,80
MIL 7	16,00 a	37,00 b	63,50 c	77,50 c	39,60
MÉDIA	11,80	27,18	46,40	78,75	41,03

Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados obtidos, embora a natureza química dos filtrados não tenha sido determinada, sugerem a presença de substâncias tóxicas produzidas em meio de cultura pelo metabolismo das bactérias, que quando diluídas em água, diminuem o seu efeito nematicida. Dessa forma, torna-se necessária a continuação de trabalhos nessa linha de pesquisa, a fim de que sejam caracterizadas as substâncias presentes nesses filtrados de culturas bacterianas.

4 CONCLUSÕES

- 1- Filtrados de culturas de bactérias endofíticas afetam a motilidade, mortalidade e a eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.
- 2- Melhores efeitos dos filtrados dos isolados bacterianos sobre a motilidade, mortalidade e a eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* foram observados quando os mesmos não foram diluídos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo*, v.6, p.285-327, 1998.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; SOUZA, I.S.; BELARMINO, L.C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira, Jaboticabal*, v.21, n.2, p.12-21, June 1998.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter, Washington*, v.57, n.2, p.1025-1028, Dec. 1973.
- IGNOFFO, C.M.; DROPKIN, V.H. Deleterious effect of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil inhabiting, miceliophagous, and plant parasitic nematodes. *Journal of Kansas Entomological Society, Kansas*, v.50, n.3, p.394-398, July 1977.
- JACQ, V.A.; FORTUNER, R. Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. *Revue de Nematologie, Paris*, v.2, n.1, p.41, Jan. 1979.
- JOHNSTON, T.M. Effect of fatty acids mixtures on the rice stylet nematode (*Tylenchorhynchus martini* Fielding, 1956). *Nature, London*, v.183, n.3696, p.1392, Dec. 1959.
- KLOEPPER, J.W. LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature, London*, v.286, n.5775, p.835-836, Aug. 1980.
- LIZUKA, H.; KOMAGATA, T.; KUNII, Y.; SHIBUYA, M. Nematocidal action of microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry, Tokio*, v.26, n.2, p.199, Feb. 1962.
- MCINROY, J.A. ; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil, Dordrecht*, v.173, n.2, p.337-342, Jan. 1995.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology, St. Paul*, v.80, n.9, p.808-811, Sept. 1990.

- NEILANDS, J.B. microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v.50, p.715-731, 1981.
- OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v.3, n.2, p.115-126, Apr./June 1993.
- QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Nematode interactions with endophytes II: effect of nematode density on colonization of endophytic bacteria. In: **INTERNATIONAL NEMATODOLOGY CONGRESS**, 3., Gosier, 1996. Guadeloupe Antilles, Abstracts... Gosier, Guadeloupe Antilles: Society Nematology, 1996. p.135-136.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; JORDAN, J.W.; HOLLIS, J.P. Nematodes biological control in rice fields: role of hydrogen sulfide. *Science*, Louisiana, v.148, n. 3669, p.524, Apr. 1965.
- SAYRE, R.M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *Journal of Nematology*, De Leon Springs, v.12, n.4, p.260-270, Oct. 1980.
- SCOTT, A.; J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Raleigh, v.30, n.3, p. 507-512, Sept. 1974.
- SIKORA, A.; HOFFMANN-HERGARTEN, S. Nematode interactions with plant health promoting rhizobacteria. In: **INTERNATIONAL NEMATODOLOGY CONGRESS**, Gosier, 3., Guadeloupe Antilles. Abstracts... Gosier, Guadeloupe Antilles: Society Nematology, 1996. p.72-73.
- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 35, n.1, p. 456-463, Jan. 1989.
- WILT, G.R.; SMITH, R.E. Studies on the interactions of aquatic bacteria and aquatic nematodes. *Water Resources Research Institute Bulletin*, Raleigh, v.1, n.4, p.701, Oct.1970.

CAPÍTULO 4

ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS À FORMAÇÃO DE GALHAS E À REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO.

RESUMO

NAVES, Rosemeire de Lellis. Antagonismo de bactérias endofíticas à formação de galhas e à reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. In: _____. **Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides.** Lavras: UFLA, 2000. Cap.4, p.84-103 . (Tese - Doutorado em Fitotecnia).*

O potencial de bactérias endofíticas isoladas do sistema radicular de plantas de tomate, *Crotalaria* sp., trigo e braquiária, no controle biológico de *Meloidogyne javanica*, foi avaliado em casa-de-vegetação, utilizando-se mudas de tomateiro. Foram testados 40 isolados bacterianos e dois métodos de inoculação da bactéria: microbiolização de sementes e irrigação do substrato. Quinze dias após a semeadura, 400 ovos de *Meloidogyne javanica* em solução aquosa foram colocados ao redor de cada planta. Trinta dias após a infestação do substrato com o nematóide, foram avaliados a altura de planta, peso da matéria seca da parte aérea, peso da matéria fresca do sistema radicular, o número de galhas e de ovos por grama de raiz. Todos os isolados testados diferiram da testemunha quanto ao número de galhas por grama de raiz, apresentando percentuais de redução que variaram entre 18,79% e 58,68%. Apenas três isolados não diferiram da testemunha quanto ao número de ovos por grama de raiz. Reduções significativas, entre 20,75% e 64,87%, no número de ovos por grama de raiz, foram observados para os demais isolados testados. Sete isolados bacterianos induziram as maiores reduções do número de galhas e de ovos por grama de raiz, concomitantemente. Nenhum dos quarenta isolados testados mostrou efeito no crescimento das plantas, não havendo, também, diferença significativa entre as médias dos métodos de inoculação testados.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador) – Ricardo Magela de Souza – UFLA.

ABSTRACT

NAVES, Rosemeire de Lellis. Antagonism of endophytic bacteria to the galls formation and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. In: _____ **Endophytic bacteria of the root system: isolation and potential for the biological control of plant parasitic nematodes.** Lavras: UFLA, 2000. Cap. 4, p. 84-103. (Thesis – Doctorate in Crop Science).*

In greenhouse, the antagonism of the forty isolates to galls formation and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato was evaluated. Two inoculation methods of bacteria were tested: seed microbiolization and substrate irrigation. Fifteen days after sowing, 400 eggs in aqueous solution were placed around each plant. Thirty days after the substrate infestation with nematode, plant height, shoot dry matter weight, root system dry weight, number of galls and eggs per gram of root were evaluated. All isolates reduced the number of galls as compared to the control. The reduction varied from 18,79% to 58,68%. Only three bacterial isolates did not affect the nematode reproduction when compared to control. All others isolates induced significant reductions on number of eggs per gram of the root, varying from 20,75% to 64,87% compared to control. Simultaneous reduction on number of galls and number of eggs per gram of the root was induced by seven bacterial isolates only. No bacterial isolates promoted plant growth. Differences between inoculation methods were not observed.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor) – Ricardo Magela de Souza – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias no controle biológico de fitonematóides tem recebido atenção apenas nas últimas décadas, sendo enfatizadas as bactérias parasitas do gênero *Pasteuria* e as rizobactérias (Campos, Souza e Souza, 1998).

As bactérias endofíticas, devido a sua capacidade de viver no interior dos tecidos da planta, escapam da competição com outros microrganismos do solo (Misaghi e Donndelinger, 1990), podendo estar melhor adaptadas a sobreviver nesse ambiente competitivo, beneficiando-se do catabolismo de metabólitos de plantas (McInroy e Kloepper, 1995). Desta forma, tornam-se candidatas potenciais ao controle biológico de nematóides depois de sua penetração na raiz. As primeiras camadas de células das raízes são colonizadas por bactérias que não causam doenças na planta. Algumas promovem o crescimento das plantas (Bashan et al., 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Kloepper, Wei e Tuzun, 1992; Hurek et al., 1994; Hinton e Bacon, 1995; Nowak et al., 1995; Sturz, 1995), outras, cujo papel ainda não é bem conhecido, podem proteger esse órgão contra o ataque de patógenos (Hallmann et al., 1995); Nowak et al., 1995; Pleban, Ingel e Chet, 1995; Nascimento, 1998).

Há algumas evidências de que bactérias endofíticas possam contribuir para o controle de nematóides fitoparasitas (Hallmann et al., 1995), embora a eficácia do antagonismo bacteriano seja limitada nesse caso, uma vez que os danos de nematóides ocorrem como resultado de seu hábito alimentar e migração interna (Hallmann et al., 1997). Todavia, fitonematóides endoparasitas sedentários podem ser um alvo interessante para o antagonismo endofítico, já que eles permanecem dentro da planta por várias semanas e alimentam-se em um único local (Hallmann et al., 1997).

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, avaliar, em casa-de-vegetação, o potencial de bactérias endofíticas isoladas dos sistemas radiculares

sadios de plantas tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) , crotalária (*Crotalaria* sp. L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.) e braquiária (*Crotalaria* spp. L.) no controle biológico de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, 1949, em tomateiro, aplicadas através de dois métodos: microbiolização de sementes e irrigação do substrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O potencial antagonico de isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir do sistema radicular de plantas de tomate, crotalaria, trigo, milho e braquiária a *Meloidogyne javanica* foi avaliado em casa-de-vegetação, utilizando-se mudas de tomateiro Santa Clara. Foram testados 40 isolados bacterianos (TABELA 1) e dois métodos de inoculação da bactéria: microbiolização de sementes e irrigação do substrato. O ensaio foi montado em bandejas de poliestireno com 72 células, com 36 gramas de substrato orgânico Plantmax por célula.

TABELA 1. Notificação do isolados de bactérias endofíticas e as plantas hospedeiras. UFLA, Lavras-MG, 2000.

PLANTAS HOSPEDEIRAS	Nº DE ISOLADOS	CÓDIGOS DOS ISOLADOS
Milho (<i>Zea mays</i>)	20	MIL 1, MIL2, MIL3, MIL4, MIL5, MIL6, MIL7, MIL8, MIL9, MIL10, MIL11, MIL12, MIL13, MIL14, MIL15, MIL16, MIL17, MIL19, MIL20, MIL21
Braquiária (<i>Brachiaria</i> sp.)	16	BRA2, BRA4, BRA5, BRA6, BRA8, BRA9, BRA10, BRA11, BRA12, BRA13, BRA14, BRA15, BRA17, BRA18, BRA19, BRA20
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	01	TOM 1
Crotalária (<i>Crotalaria</i> sp.)	01	CRO 1
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	02	TRI 1, TRI 2
TOTAL	40	

2.1 Preparo do inóculo bacteriano.

Os isolados de bactérias endofíticas preservados em meio líquido peptona-glicerol em freezer, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram transferidos para placas de Petri contendo meio 'tryptic soy agar' (TSA) e incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com os isolados bacterianos, adicionando-se às placas solução salina de MgSO_4 0,1M homogeneizando-a com auxílio de alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada, em espectrofotômetro, para $T_{580\text{nm}} = 20\%$.

2.2 Inoculação de bactérias endofíticas pela microbiolização de sementes.

As sementes de tomateiro 'Santa Clara' foram desinfestadas superficialmente através de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e, em seguida, enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. Após secagem com auxílio de papel de filtro, as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas por 15 minutos e semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato orgânico Plantmax. Colocaram-se 4 sementes por célula, sendo feito o desbaste 7 dias após a semeadura, deixando-se uma plântula por célula.

2.2 Inoculação de bactérias endofíticas pela irrigação do substrato.

A irrigação do substrato na bandeja foi feita através da distribuição de 10ml de suspensão bacteriana por célula. Após a homogeneização do substrato, 4 sementes de tomateiro 'Santa Clara' desinfestadas superficialmente, conforme

descrito em 2.2., foram semeadas por célula, sendo feito desbaste 7 dias após a semeadura, deixando uma plântula por célula.

2.4 Obtenção do inóculo e inoculação de *Meloidogyne javanica*.

Os ovos empregados como inóculo de *Meloidogyne javanica* foram extraídos de raízes de tomateiro 'Santa Clara' mantidas em casa-de-vegetação através de técnica proposta por Hussey e Barker (1973). Para tanto, raízes de tomateiro com galhas foram cuidadosamente lavadas com água de torneira em bandeja e, em seguida, cortadas em pedaços de 0,5cm de comprimento e trituradas em liquidificador com 200ml de hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras de 0,075mm sobre 0,038mm de abertura. O material retido na peneira de 0,038mm foi coletado num becker com auxílio de piseta com água, completando-se todo o processo em 2 minutos. A suspensão de ovos obtida, com auxílio de microscópio estereoscópio, foi quantificada e ajustada para 200 ovos/ml.

Quinze dias após a semeadura, 400 ovos de *Meloidogyne javanica* em solução aquosa foram colocados em cada célula da bandeja, através de dois orifícios feitos no substrato, próximos ao colo da plântula, em lados opostos, com auxílio de bastão de vidro.

2.5 Avaliação.

40 Trinta dias após a infestação do substrato com o nematóide foram avaliadas as seguintes variáveis: altura de planta, peso da matéria fresca do sistema radicular, peso da matéria seca da parte aérea, números de galhas e de ovos por grama de raiz. Cada planta foi cuidadosamente retirada da bandeja e

cortada na altura do coleto para separação da parte aérea e raízes. Com auxílio de uma régua graduada foi medida a altura da parte aérea, que foi acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa a 50 °C. A secagem foi feita por 24 horas e após resfriamento, as partes aéreas das plantas foram pesadas em balança eletrônica.

Após separadas da parte aérea, as raízes foram cuidadosamente lavadas em água parada e secas com auxílio de papel absorvente, sendo em seguida pesadas em balança eletrônica. A contagem de galhas foi feita visualmente em todo o sistema radicular do tomateiro. Para isso, após a pesagem, as raízes foram imersas em solução de floxina B a 0,0015%, durante 20 minutos, para facilitar a visualização das galhas, as quais foram contadas empregando-se um contador manual. O número total de galhas foi dividido pelo peso da matéria fresca do sistema radicular. Todo o sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5cm de comprimento e os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey e Barker (1973) e quantificados conforme descrito em 2.4. O número total de ovos foi dividido pelo peso da matéria fresca do sistema radicular.

2.6 Delineamento experimental.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação e montado em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 40 X 2, mais um tratamento adicional, constituído da planta testemunha, cujo substrato foi infestado apenas com o nematóide. Para avaliação das características de crescimento e desenvolvimento da planta, foi acrescentado mais um tratamento adicional, constituído de plântula sem bactéria e sem nematóide. Foram testados 40 isolados bacterianos e dois métodos de inoculação de bactérias endofíticas: microbiolização de sementes e irrigação do substrato. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, sendo cada parcela constituída por 3 plântulas. Os dados

obtidos foram transformados em $y = \sqrt{x + 0,5}$, submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (Scott e Knott, 1974), ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos isolados de bactérias endofíticas no número de galhas e número de ovos por grama de raiz no tomateiro.

Todos os quarenta isolados de bactérias endofíticas testados reduziram significativamente o número de galhas por grama de raiz quando comparados à testemunha inoculada apenas com nematóide. As reduções no número de galhas por grama de raiz variaram de 18,79% a 58,68%. (TABELA 2). Resultados semelhantes foram observados por Hallmann et al. (1995), que relataram reduções de até 50% no índice de galhas produzidas por *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, em plantas de pepino, devido ao tratamento com sete isolados de rizobactérias endofíticas. Apenas três isolados não diferiram da testemunha quanto ao número de ovos por grama de raiz (TABELA 2). Reduções no número de ovos por grama de raiz, que variaram de 20,75% e 64,87%, foram observadas para os demais isolados.

Bactérias da rizosfera e do rizoplane também têm demonstrado o seu potencial no controle de fitonematóides. Coimbra (1998) observou reduções entre 17,38% e 45,09% no número de galhas por grama de raiz e 40,32% a 100% no número de ovos por grama de raiz, em tomateiro, devido à bacterização de raízes com rizobactérias.

TABELA 2. Efeito do isolados bactérias endofíticas no número de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz em tomateiro. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	GALHAS/ G DE RAIZ		OVOS/ G DE RAIZ	
	NÚMERO	% REDUÇÃO*	NÚMERO	% REDUÇÃO*
MIL 5	22,48 a	58,68	215,92 a	61,10
MIL 21	22,90 a	45,60	263,87 a	52,43
MIL 7	23,10 a	57,54	222,77 a	59,84
TRI 1	23,62 a	56,58	307,19 b	46,62
MIL 3	23,79 a	56,27	455,65 d	17,85
MIL 6	24,47 a	55,02	225,93 a	59,27
BRA 2	24,91 a	54,21	316,77 b	42,89
MIL 13	25,26 a	53,57	261,08 a	52,93
BRA 5	25,44 a	53,24	339,77 b	38,75
MIL 12	25,51 a	53,11	406,53 c	26,71
TRI 2	26,12 a	51,99	315,78 b	43,07
CRO 1	26,45 a	51,38	368,80 c	33,51
MIL 10	26,64 a	51,03	354,82 c	36,03
BRA 13	27,16 a	50,07	285,94 b	48,45
BRA 6	27,27 a	49,87	306,10 b	44,82
BRA 4	27,46 a	49,52	238,88 a	56,94
TOM 1	27,53 a	49,39	322,02 b	41,95
BRA 18	27,60 a	49,29	319,27 b	42,44
MIL 14	27,62 a	49,23	307,84 b	44,50
BRA 10	28,16 a	48,24	348,12 b	37,24
MIL 11	28,19 a	48,18	362,20 c	34,70
MIL 9	28,21 a	48,14	269,73 a	51,37
BRA 15	28,80 b	47,06	303,24 b	45,33
MIL20	29,30 b	46,16	301,89 b	45,58
MIL 19	29,42 b	45,92	194,85 a	64,87
MIL 15	31,10 b	42,83	291,74 b	47,40
MIL 2	31,30 b	42,48	414,24 c	25,32
MIL 8	31,51 b	42,08	269,40 a	51,43
MIL 16	31,63 b	41,86	381,76 c	31,18
BRA 19	31,74 b	41,66	361,54 c	34,82
BRA 12	31,78 b	41,58	339,94 b	38,72
MIL 4	32,35 b	40,53	284,81 b	48,65
BRA 14	33,28 b	38,81	319,45 b	42,41
MIL 17	34,53 c	36,53	500,52 d	9,77
BRA 11	36,06 c	33,71	380,26 c	31,45
BRA 9	36,90 c	32,17	499,87 d	9,88
BRA 20	37,69 c	30,72	406,27 c	26,76
BRA 8	40,90 d	24,82	389,21 c	29,83
BRA 17	41,13 d	24,39	387,83 c	30,08
MIL 1	44,18 d	18,79	439,57 c	20,75
TEST	54,40 e		554,69 d	

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

* Calculada com base na testemunha.

Vinte e dois isolados foram incluídos no grupo de maiores redutores do número de galhas por grama de raiz pelo teste de Scott e Knott (1974) ao nível de 5% de probabilidade, enquanto para o número de ovos por grama de raiz apenas nove isolados foram incluídos no primeiro grupo (TABELA 2). Desses isolados apenas sete – BRA4, MIL 5, MIL 6, MIL7, MIL9, MIL 13 e MIL21- mostraram maiores reduções do número de galhas e ovos por grama de raiz, concomitantemente.

Para as variáveis número de galhas e ovos por grama de raiz, não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação, bem como interação entre os métodos de inoculação e os isolados testados.

Poucos trabalhos foram realizados com bactérias endofíticas no controle de fitonematóides. No entanto, bactérias endofíticas têm se mostrado candidatas potenciais a agentes de controle biológico, principalmente por colonizarem um nicho ecológico semelhante aos fitopatógenos. Kloepper, Wei e Tuzun (1992), relataram que rizobactérias induziram resistência sistêmica, em pepineiro, a *Colletotrichum orbiculare*, exibindo colonização externa e interna da raiz. Em de casa-de-vegetação, bactérias endofíticas selecionadas *in vitro* para o controle de *Ceratocystis fagacearum*, agente causal da murcha do carvalho, causaram redução de 39% de plantas doentes (Brooks et al., 1994). Bactérias endofíticas também mostraram controle significativo nos sistemas *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro (Chen et al., 1995), *Verticillium alboatrum* e *Rhizoctonia solani* em batateira (Nowak et al., 1995), *Rhizoctonia solani* em algodoeiro (Pleban, Ingel e Chet, 1995) e *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro (Pleban, Ingel e Chet 1995).

Bactérias endofíticas têm mostrado também potencial antagônico contra bactérias fitopatogênicas. Van Buren, Andre e Ishimaru (1993) verificaram que quatro isolados de bactérias endofíticas preveniram, em casa-de-vegetação, o aparecimento de sintomas da podridão anelar em batateira, causada por *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*. O isolado 89B-27 de *Pseudomonas fluorescens* e o isolado 90-166 de *Serratia marcescens* foram observados como indutores de resistência em pepineiro a *Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans* (Liu, Kloepper e Tuzun, 1995). Isolados obtidos de folha de repolho, usados no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra em repolho, causaram 70,8% de redução da incidência da doença (RID) em casa-de-vegetação e 77% de redução da severidade da doença (RSD) em condições de campo (Assis et al., 1998). Utilizando isolados obtidos de *Ipomea* sp., Nascimento (1998) observou, em casa-de-vegetação, redução significativa na incidência de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro.

3.2 Efeito dos isolados de bactérias endofíticas na altura de planta, peso da matéria seca de parte aérea e peso da matéria fresca do sistema radicular.

Nenhum dos isolados testados mostrou efeito na promoção do crescimento de planta. Diferenças significativas entre as médias de altura de planta, peso da matéria seca de parte aérea e peso da matéria fresca do sistema radicular apresentadas pelas plantas tratadas com os isolados bacterianos e as plantas testemunhas inoculadas só com *Meloidogyne javanica* ou não inoculadas nem bactérias nem com nematóides, não foram observadas (TABELA 3), provavelmente devido ao período de tempo relativamente curto ao qual as plântulas de tomate foram expostas aos isolados bacterianos.

TABELA 3. Altura de planta, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria fresca do sistema radicular em tomateiro após tratamento com diferentes isolados de bactérias endofíticas e inoculação com *Meloidogyne javanica*. UFLA, Lavras-MG, 2000.

ISOLADO	PESO MATERIA FRESCA RAIZ (g)	ALTURA DE PLANTA (cm)	PESO MATERIA SECA DE PARTE AÉREA (g)
TOM 1	3,25 a	39,63 a	0,72 a
CRO 1	2,98 a	39,46 a	0,74 a
TRI 1	3,55 a	40,21 a	0,75 a
TRI 2	3,47 a	38,88 a	0,76 a
MIL 1	3,20 a	39,00 a	0,73 a
MIL 2	3,39 a	40,46 a	0,73 a
MIL 3	3,62 a	37,50 a	0,76 a
MIL 4	2,71 a	40,94 a	0,76 a
MIL 5	3,00 a	37,38 a	0,69 a
MIL 6	3,47 a	40,08 a	0,76 a
MIL 7	3,06 a	38,24 a	0,77 a
MIL 8	2,96 a	38,17 a	0,68 a
MIL 9	3,48 a	41,13 a	0,75 a
MIL 10	2,74 a	40,13 a	0,78 a
MIL 11	3,15 a	41,46 a	0,79 a
MIL 12	5,88 a	39,96 a	0,76 a
MIL 13	2,99 a	38,00 a	0,81 a
MIL 14	3,19 a	38,75 a	0,76 a
MIL 15	2,91 a	42,07 a	0,79 a
MIL 16	3,02 a	41,12 a	0,75 a
MIL 17	3,44 a	37,71 a	0,76 a
MIL 19	3,28 a	40,21 a	0,75 a
MIL 20	3,29 a	38,04 a	0,76 a
MIL 21	3,14 a	40,46 a	0,80 a
BRA 2	3,32 a	37,17 a	0,73 a
BRA 4	3,27 a	37,46 a	0,69 a
BRA 5	2,90 a	39,04 a	0,75 a
BRA 6	2,73 a	41,29 a	0,77 a
BRA 8	3,02 a	41,96 a	0,77 a
BRA 9	2,92 a	38,42 a	0,75 a
BRA 10	3,00 a	39,48 a	0,72 a
BRA 11	3,30 a	39,75 a	0,77 a
BRA 12	3,08 a	38,23 a	0,76 a
BRA 13	3,16 a	40,46 a	0,71 a
BRA 14	3,19 a	38,00 a	0,73 a
BRA 15	3,14 a	39,13 a	0,78 a
BRA 17	3,22 a	38,79 a	0,78 a
BRA 18	3,65 a	40,54 a	0,76 a
BRA 19	3,82 a	39,33 a	0,74 a
BRA 20	2,91 a	38,62 a	0,76 a
TEST	3,83 a	39,42 a	0,77 a
TEST (+NEM)	2,60 a	38,83 a	0,77 a

Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

No entanto, bactérias endofíticas têm sido associadas com a promoção do crescimento em diversas culturas, incluindo plantas de tomate, alface (Bashan et al., 1989; Van Peer e Schippers, 1989; Nowak et al., 1995), batata (Van Peer e Schippers, 1989; Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991; Sturz, 1995), milho (Lalande et al., 1989; Hinton e Bacon, 1995), pepino (Van Peer e Schippers, 1989; Kloepper, Wei e Tuzun, 1992; Nowak et al., 1995), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989). Aproximadamente 10% de isolados bacterianos recuperados de dentro de tubérculos de batata mostraram promoção de crescimento de planta (Sturz, 1995). O isolado PsJN de *Pseudomonas* sp. não fluorescente induziu aumento significativo no número de raízes de batateira (24-196%), peso de matéria seca de raiz (44-211%) e comprimento de caule (26-28%), bem como aumento de formação de pelos foliares (55-11%), ramificações secundárias e conteúdo total de lignina (43%) (Frommel, Nowak e Lazarovits, 1991). Van Peer e Schippers (1989) observaram que plântulas de tomate inoculadas com o isolado WCS417r de *Pseudomonas* sp. mostraram aumento no crescimento de planta acompanhado por densa colonização do isolado aplicado nos tecidos internos da raiz .

Também não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de inoculação testados, microbiolização de sementes e irrigação do substrato, nem interação entre os métodos de inoculação e os isolados bacterianos. Entretanto, estudos comparando vários métodos de inoculação, indicaram que o método de aplicação de bactérias endofíticas para introdução no tecido da planta é específico para cada isolado (Musson, McInroy e Kloepper, 1995). A microbiolização de sementes e irrigação do solo oferecem proteção para a plântula desde o início da germinação da semente. Além disso, o tratamento de sementes parece ser um método rápido, economicamente prático e viável para introdução de bactérias endofíticas (Hallmann et al., 1997). Entretanto, a combinação de tratamento de sementes com irrigação do solo pode



aumentar a colonização endofítica dentro da planta e a consistência dos efeitos benéficos. Os conhecimentos a respeito da forma de penetração e colonização das bactérias endofíticas nas plantas, contudo, ainda são limitados e o desenvolvimento da tecnologia de aplicação dependerá do aumento do conhecimento sobre a ecologia desses organismos (Hallmann et al., 1997).



4 CONCLUSÕES

- 1- Os isolados de bactérias endofíticas testados tiveram efeito antagônico à formação de galhas e reprodução de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro, embora essa ação antagônica tenha sido diferenciada.
- 2- Os métodos de inoculação de bactérias endofíticas testados mostraram-se igualmente eficientes para todos os isolados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagonico no controle da podridão negra em repolho. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p. 216-220, jul./dez. 1998.

BASHAN, Y.; REAM, Y.; LEVANONY, H.; SADE, A. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.67, n.5, p.1317-1324, May 1989.

BROOKS, D.S.; GONZALES, C.F.; APPEL, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agent for oak wilt. *Biological Control*, Madison, v.4, n.3, p.373-381, Mar. 1994.

CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 6, p.285-327, 1998.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, Madison, v.5, n.1, p.83-91, Jan. 1995.

COIMBRA, J.L. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* sp. Lavras: UFLA, 1998. 75p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grow potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, Rockville, v.96, n.3, p.928-936, July 1991.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SIKORA, R.A. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* in cucumber. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, n.10, p.1136, Oct. 1995.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.10, p. 895-914, Oct. 1997.

HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, Amsterdam, v. 129, n.1, p.117-125, Jan. 1995.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, Washinton, v.76, n.7, p.1913-1923, Apr. 1994.

msl
HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, Washington, v.57, n.2, p.1025-1028, Dec. 1973.

KLOEPPER, J.W.; WEI, G.; TUZUN, S. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria wich induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: TJAMOS, E.S. (ed.) *Biological control of plant diseases*. New York: Plenum Press, 1992. p.185-191.

LALANDE, R. ; BISSONNETTE, N.; COUtlÉE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.115, n.1, p. 7-11, Jan. 1989.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria.. *Phytopathology*, St. Paul, v.85, n.8, p.843-847, Aug. 1995.

MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 173, n.2, p.337-342, June 1995.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, St. Paul, v. 80, n. 9, p. 808-811, Sept. 1990.

MUSSON, G.; MCINROY, J.A. ; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v.5, n.2, p.407-416, July/Sept. 1995.

- NASCIMENTO, A .S. Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibater michiganensis* subsp. *michiganensis* e tomateiro. Brasília: UnB, 1998. 91p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia), 1998.
- NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; LAZAROVITS, G.; PILAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetables plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (eds.) *Ecophysiology and photosyntetic in vitro cultures*. France: Commissariat à l'energie atomique, 1995. p. 173-179.
- PLEBAN, S.; INGEL, F; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, London, v. 101, n.3, p. 665-672, May/June 1995.
- SCOTT, A.; J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Raleigh, v.30, n.3, p. 507-512, Sept. 1974.
- STURZ, A .V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.175,n.2, p. 257-263, Aug. 1995.
- VAN BUREN, A .M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, C.A . Biological control of the bacterial ring-spot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.12, p.1406, Dec. 1993.
- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with seleted *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canandian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 35, n.1,p. 456-463, Jan. 1989.

ANEXOS

	Página
ANEXO A	106
TABELA 1 A: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio	106
TABELA 2 A: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio	106
TABELA 3 A: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio	106
TABELA 4 A: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio	106
TABELA 5 A: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 15 dias de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio	107
ANEXO B	108
TABELA 1 B: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio	108
TABELA 2 B: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio	108
TABELA 3 B: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio	108
TABELA 4 B: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio	108
TABELA 5 B: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis eclodido após 15 dias de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio	109

ANEXO C.....	110
TABELA 1 C: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.....	110
TABELA 2 C: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.....	110
TABELA 3 C: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.....	110
TABELA 4 C: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.....	111
TABELA 5 C: Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis eclodidos após 15 dias de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.....	111
ANEXO D.....	112
TABELA 1 D: Resumo da análise de variância do número de ovos por grama de raiz de tomateiro.....	112
TABELA 2 D: Resumo da análise de variância do número de galhas por grama de raiz de tomateiro.....	112
TABELA 3 D: Resumo da análise de variância altura de planta de tomate.....	112
TABELA 4 D: Resumo da análise de variância do peso da matéria seca de parte aérea de tomateiro.....	113
TABELA 5 D: Resumo da análise de variância do peso da matéria fresca do sistema radicular de tomateiro.....	113

ANEXO A

TABELA 1 A. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	24,07180	1,09417	251,222	0,0000
ERRO	69	0,30052	0,00436		
TOTAL	91	24,37233			

CV= 12,1513%

TABELA 2 A. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	27,55511	1,25250	74,869	0,0000
ERRO	69	1,15432	0,01673		
TOTAL	91	28,70943			

CV= 18,4293%

TABELA 3 A. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	23,48973	1,06771	214,617	0,0000
ERRO	69	0,34327	0,00497		
TOTAL	91	23,83300			

CV= 13,2086%

TABELA 4 A. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	27,54558	1,25207	75,180	0,0000
ERRO	69	1,14915	0,01665		
TOTAL	91	28,69473			

CV= 18,3829%

TABELA 5 A. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 15 dias de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no primeiro ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	22,16755	1,00762	131,440	0,0000
ERRO	92	0,70527	0,00767		
TOTAL	114	22,87282			

CV=8,37777%

ANEXO B

TABELA 1 B. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	16,65871	0,75721	156,720	0,0000
ERRO	69	0,33338	0,00483		
TOTAL	91	16,99210			

CV= 13.2819%

TABELA 2 B. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	18,19777	0,82717	179,649	0,0000
ERRO	69	0,31770	0,00460		
TOTAL	91	18,51547			

CV=8,0156%

TABELA 3 B. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	17,55993	0,79818	45,376	0,0000
ERRO	69	1,21373	0,01759		
TOTAL	91	18,77366			

CV= 25,6425%

TABELA 4 B. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	18,19575	0,82708	179,855	0,0000
ERRO	69	0,31730	0,00460		
TOTAL	91	18,51305			

CV=8,0107%

TABELA 5 B. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis eclodido após 15 dias de exposição aos filtrados de cultura dos isolados bacterianos utilizados no segundo ensaio.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADOS	22	16,15709	0,73441	38,807	0,0000
ERRO	92	1,74108	0,01892		
TOTAL	114	17,89817			

CV=12,9740%

ANEXO C

TABELA 1 C. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 24 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADO	7	0,04795	0,00685	1,307	0,2553
DILUIÇÃO	3	23,12972	7,70991	1471,290	0,0000
ISSO * DILU	21	0,38812	0,01848	3,527	0,0000
ERRO	96	0,50306	0,00524		
TOTAL	127	24,06885			

CV=8,7317%

TABELA 2 C. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis imóveis após 48 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADO	7	0,05119	0,00731	1,297	0,2599
DILUIÇÃO	3	26,80247	8,96416	1584,881	0,0000
ISSO * DILU	21	0,29414	0,01401	2,485	0,0015
ERRO	96	0,54116	0,00564		
TOTAL	127	27,68896			

CV=7,8322%

TABELA 3 C. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 24 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADO	7	0,04795	0,00685	1,307	0,2553
DILUIÇÃO	3	23,12972	7,70991	1471,290	0,0000
ISSO * DILU	21	0,38812	0,01848	3,527	0,0000
ERRO	96	0,50306	0,00524		
TOTAL	127	24,06885			

CV= 8,7317

TABELA 4 C. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis mortos após 48 horas de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADO	7	0,07465	0,01066	0,491	0,8392
DILUIÇÃO	3	25,98729	8,46243	389,471	0,0000
ISSO * DILU	21	0,66605	0,03172	1,460	0,1110
ERRO	96	2,08589	0,02173		
TOTAL	127	28,21387			

CV=15,5761%

TABELA 5 C. Resumo da análise de variância da percentagem de juvenis eclodidos após 15 dias de exposição às diferentes diluições aos filtrados de cultura de 8 isolados bacterianos.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
ISOLADO	7	0,36042	0,05149	12,462	0,0000
DILUIÇÃO	3	12,38667	4,12889	999,311	0,0000
ISSO * DILU	21	0,29942	0,01426	3,451	0,0000
ERRO	128	0,52886	0,00413		
TOTAL	159				

ANEXO D

TABELA 1 D. Resumo da análise de variância do número de ovos por grama de raiz de tomateiro.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
BLOCO	3	33,77253	11,25751	2,6787	0,0298
MET INOCU	1	1,98288	1,98288	0,4718	0,4652
ISOLADO	39	1254,04015	32,15488	7,6513	0,0000
MET *ISOL	39	68,25702	1,75018	0,4165	0,9969
ERRO	241	1012,80561	4,20251		
TOTAL	323	2360,85819			

CV=10,6068%

TABELA 2 D. Resumo da análise de variância do número de galhas por grama de raiz de tomateiro.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
BLOCO	3	9,24712	3,08237	10,9139	0,0000
MET INOCU	1	0,09855	0,09855	0,3489	0,5030
ISOLADO	39	66,94883	1,71664	6,0782	0,0000
MET *ISOL	39	4,64846	0,11919	0,4220	0,9877
ERRO	241	68,06464	0,28243		
TOTAL	323	149,00760			

CV=8,5657%

TABELA 3 D. Resumo da análise de variância altura de planta de tomate.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
BLOCO	3	3,44835	1,14945	11,6273	0,0000
MET INOCU	1	0,35406	0,35406	3,5815	0,0566
ISOLADO	39	3,51970	0,09025	0,9129	0,5839
MET *ISOL	39	2,90736	0,07455	0,7541	0,8320
ERRO	245	24,22017	0,09886		
TOTAL	327	34,44964			

CV=4,9747%

TABELA 4 D: Resumo da análise de variância do peso da matéria seca de parte aérea de tomateiro.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
BLOCO	3	0,16273	0,05424	23,3565	0,0000
MET INOCU	1	0,00069	0,00069	0,2971	0,6006
ISOLADO	39	0,05135	0,00132	0,5669	0,9913
MET *ISOL	39	0,02422	0,00062	0,2674	1,0000
ERRO	245	0,56899	0,00232		
TOTAL	327	0,80798			

CV=4,4851%

TABELA 5 D: Resumo da análise de variância do peso da matéria fresca do sistema radicular de tomateiro.

F.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
BLOCO	3	0,39857	0,13286	12,5124	0,0000
MET INOCU	1	0,00592	0,00592	0,5575	0,4617
ISOLADO	39	0,16320	0,00418	0,3941	0,9997
MET *ISOL	39	0,13130	0,00337	0,3171	1,0000
ERRO	245	2,60141	0,01062		
TOTAL	327	3,30040			

CV=5,8451%