



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO DOS
NEMATÓIDES DE GALHAS**

JOÃO LUIZ COIMBRA

2003

JOÃO LUIZ COIMBRA

**ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO
DOS NEMATOÍDES DE GALHAS**

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

Orientador

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003



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

Coimbra, João Luiz

Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas /
João Luiz Coimbra. – Lavras : UFLA, 2003.

111 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Actinomicetos. 2. Controle biológico. 3. *Meloidogyne javanica*. 4.
Reprodução. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.182
-632.96

JOÃO LUIZ COIMBRA

**ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO
DOS NEMATÓIDES DE GALHAS**

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

APROVADA em 21 de maio de 2003

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza – DFP/UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves – DFP/UFLA

Profª. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira – DCS/UFLA

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro – DFP/UFV



Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
(Orientador)
DFP/UFLA

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

A Deus, pela dádiva da vida e pela força na realização deste trabalho,

OFEREÇO

A meus pais, Antônio e Márcia, pelo apoio e confiança. À minha esposa, Cida e meu filho, João Vitor, pelo carinho e pela força.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela boa formação profissional e pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Departamento de Fitopatologia, pelo apoio e oportunidade de trabalho e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq, pela concessão de bolsa durante o curso.

Ao Professor Vicente Paulo Campos, pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Ao Cleber Maximiliano, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Tarley Luiz de Paula, pela grande ajuda na condução dos experimentos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos Arnaldo e Jorge, pelo convívio e pela grande amizade no decorrer desses anos.

Aos colegas de curso Hércules, Fernando, Varginha, Cacilda, Oneida, Barone, Viviane e aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia.

Meu sincero muito obrigado !

BIOGRAFIA DO AUTOR

JOÃO LUIZ COIMBRA, filho de Antônio Geraldo Coimbra e de Márcia Maria Vieira Coimbra, nasceu em 17 de Maio de 1972, no município de Barbacena, estado de Minas Gerais (MG). Em 25 de dezembro de 1989 concluiu o curso técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Barbacena.

Em março de 1990 ingressou na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em Lavras; acompanhou o seu processo de transformação em Universidade Federal de Lavras (UFLA), em 15 de dezembro de 1994 e obteve o título de Engenheiro Agrônomo no dia 28 de janeiro de 1995. Em março de 1995 ingressou no Programa de Controle Biológico de nematóides como bolsista de aperfeiçoamento tipo B, com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela UFLA, sob a orientação do Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, permanecendo até janeiro de 1996.

Em março de 1996 iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia, na UFLA, concentrando os seus estudos na área de Fitopatologia sob orientação do Professor Dr. Vicente Paulo Campos, obtendo o título de Mestre em 24 de setembro de 1998.

Em maio de 1999 iniciou o curso Doutorado na UFLA, também concentrando seu estudos na área de Fitopatologia, sob a orientação do Professor Dr. Vicente Paulo Campos.

Em 21 de maio de 2003, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de "Doutor".

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1: Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas.....	i
RESUMO	i
ABSTRACT	v
1 Introdução geral	1
2 Referencial teórico	3
2.1 Associação e antagonismo de actinomicetos a nematóides	4
2.1.1 Efeito de metabólitos de actinomicetos sobre fitonematóides	5
2.1.2 Relação de parasitismo ou associação entre actinomicetos e fitonematóides	7
2.2 Métodos de isolamento e preservação de actinomicetos	8
2.3 Perspectivas do uso de actinomicetos no controle de fitonematóides	12
3 Referências bibliográficas	14
CAPÍTULO 2: Efeito antagônico de actinomicetos isolados de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro	21
Resumo	22
Abstract	23
1 Introdução.....	24
2 Material e métodos	26
3 Resultados e discussão	29
4 Conclusões.....	36
5 Referências bibliográficas	37
CAPÍTULO 3 : Efeito antagônico de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro	40
Resumo	41
Abstract	43
1 Introdução	44
2 Material e métodos	45
3 Resultados e discussão	48
4 Conclusões	53

5 Referências bibliográficas	54
------------------------------------	----

CAPÍTULO 4: Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	57
Resumo.....	58
Abstract	60
1 Introdução	62
2 Material e Métodos	64
2.1 Obtenção de filtrados de culturas de actinomicetos e de exsudatos de colônias em meio sólido.....	64
2.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	65
2.3 Efeito de filtrados de culturas de actinomicetos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	66
2.4 Efeito do filtrado de culturas de actinomicetos na eclosão de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	67
2.5 Efeito de exsudatos de colônias de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	68
2.6 Efeito de diluições de filtrados de cultura de actinomicetos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	69
3 Resultados e discussão	71
3.1 Efeito de filtrados de culturas de actinomicetos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> e estudos com diluições	71
3.2 Efeito de exsudatos de colônias de actinomicetos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	76
4 Conclusões.....	82
5 Referências bibliográficas	83

CAPÍTULO 5: Parasitismo de actinomicetos a <i>Meloidogyne javanica</i>	86
Resumo	87
Abstract	88
1 Introdução.....	89

2	Material e métodos.....	90
3	Resultados e discussão	92
4	Conclusões.....	95
5	Referências bibliográficas	96
	ANEXOS.....	98

RESUMO

COIMBRA, J. L. Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas. 2003. 111 p Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Foram obtidos 64 isolados de actinomicetos a partir da rizosfera das seguintes plantas: *Hibiscus esculentus* L. (quiabeiro), *Coffea arabica* L. (cafeeiro), *Zea mays* L. (milho), *Sorghum bicolor* L. (sorgo), *Allium cepa* L. (cebola), *Solanum gilo* Raddi (jiló), *Ricinus communis* L. (mamona), *Allium sativum* L. (alho), *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. D.C. (couve), *Lactuca sativa* L. (alface), *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Bromelia antiacantha* Bertol. (gravatá), *Solanum sisymbriifolium* Lam. (joá bravo), *Bidens pilosa* L. (picão preto), *Acanthospermum hispidum* DC (carrapicho de carneiro), *Dichromena ciliata* (capim-estrela), *Melissa officinalis* L. (melissa), *Pennisetum purpureum* Schum. (capim-elefante) e *Brachiaria* sp. (brachiaria). Esses isolados foram testados no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro em sala climatizada. Para isto, sementes de tomate foram microbiolizadas na suspensão de cada isolado, semeadas em substrato Plantmax, irrigado com suspensão de esporos do mesmo isolado e adicionados ovos de *M. javanica*. Trinta dias após, contou-se o número de galhas, ovos e de massa de ovos em cada muda de tomate. Vinte e oito, dos 42 isolados obtidos de culturas de interesse econômico, representando 67% dos actinomicetos obtidos dessas rizosferas, reduziram ($P \leq 0,05$) o número de galhas de *M. javanica* em tomateiro, quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide. Sete isolados reduziram ($P \leq 0,05$) o número de massa de ovos por grama de raiz do tomateiro, porém, nenhum deles reduziu o número de ovos/g de raiz. Dois isolados, o CAF 5 e o COU 3, obtidos da rizosfera do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e da couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), respectivamente, reduziram concomitantemente o número de galhas e de massa de ovos/g de raiz do tomateiro. A cultura em que mais se isolaram actinomicetos foi a do cafeeiro com 10 isolados, seguida do quiabeiro com 7 e couve com 6. Nas demais, o número de isolados obtidos variou de 1 a 4. No entanto a porcentagem de isolados antagonistas obtidos da rizosfera de cada cultura foi diferente, com destaque para o cafeeiro com 24% e a couve com 18%. Treze dos 42 isolados obtidos de culturas representando 31% promoveram o crescimento do tomateiro aumentando a matéria seca. Coincidentemente, dois deles, isto é, CAF 5 e COU 10, obtidos da rizosfera do café e da couve, respectivamente, além de promover o crescimento, reduziram também o número

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

de galhas/g de raiz do tomateiro. Entre os isolados obtidos de plantas daninhas e gramíneas encontraram-se actinomicetos com maior porcentagem de isolados em *Solanum sisymbriifolium* (Joá bravo) e *Melissa officinalis* (Melissa). Cerca de dez isolados de actinomicetos testados reduziram significativamente o número de galhas por grama de raiz quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide, representando 45% dos isolados obtidos de ervas daninhas e gramíneas. As reduções no número de galhas por grama de raiz variaram de 27% a 65%. O número de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) por quatro isolados dos dez que reduziram também o número de galhas comparado com a testemunha inoculada apenas com nematóide, com reduções que variaram de 13% a 44%. Contudo, o número de massa de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) em dez isolados de ervas daninhas e gramíneas testados, sendo que 6 deles também reduziram o número de galhas, comparados com a testemunha. As reduções variaram de 33% a 81%. Os isolados BRA 5, GRA 3 e PIC 1 obtidos de brachiaria (*Brachiaria* sp.), gravatá (*Bromelia antiacantha* Bertol) e de picão Preto (*Bidens pilosa*), respectivamente, diminuíram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e ovos por planta de tomate. Três isolados de actinomicetos obtidos de gramíneas, entre os oito testados, demonstraram antagonismo a *M. javanica*, reduzindo galhas e ovos/g de raiz do tomateiro. Entre os 14 isolados obtidos de ervas daninhas, 7 reduziram galhas e o ovos/g de raiz. Oito isolados de actinomicetos, dentre os 22 obtidos de ervas daninhas e gramíneas testados, aumentaram ($P \leq 0,05$) a matéria seca do tomateiro representando 36% dos isolados estudados e, coincidentemente, todos eles reduziram também o número de galhas e ovos de *M. javanica*. Nos estudos com filtrados e exsudatos de colônias, 41 isolados de actinomicetos foram cultivados, inicialmente em meio de amido (SCN) e repicados para o meio líquido de extrato de malte ISP2 (MYE), de onde obtiveram-se os filtrados. Trinta e sete isolados, após o crescimento em SCN, foram repicados para meio de aveia com ágar, de onde foram obtidos os exsudatos de colônias. Ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram incubados em filtrado de meio líquido, onde cresceram actinomicetos ou em solução obtida de colônias desenvolvidas em meio sólido, e avaliadas a eclosão, mobilidade e mortalidade. A motilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 15 dos 41 isolados de actinomicetos testados em filtrado de meio de cultura, comparada com às testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou no meio líquido MYE. Dez deles reduziram a motilidade ($P \leq 0,05$) ao nível da solução de Temik. Essas reduções variaram de 12% a 100%. Contudo, a mortalidade de J2 foi significativa em 11 dos 41 isolados testados em filtrado do meio de cultura, comparada às testemunhas em que os J2

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

foram incubados em água ou no meio líquido. Dos isolados que causaram mortalidade, apenas o ALF 4 causou 75%, os demais 100%, semelhante ($P \leq 0,05$) ao nível de mortalidade ocorrida na incubação de J2 em Temik. A mortalidade ocorreu sempre que houve redução na motilidade; entretanto, em 5 isolados que causaram imobilidade não ocorreu mortalidade de J2, incubados nos filtrados. Todos os 7 isolados de actinomicetos testados em filtrados reduziram significativamente a eclosão de J2 de *M. javanica* comparada com às testemunhas em que o J2 foi incubado em água ou em meio líquido MYE, porém, semelhante ($P \leq 0,05$) àquela em solução de Temik. Esses mesmos isolados causaram 75% a 100% de mortalidade de J2. Diluições em 1:1 e 1:2 de filtrados de 4 culturas de actinomicetos reduziram em aproximadamente 75% a 85% a mortalidade de J2, respectivamente. Contudo, essas mesmas diluições não alteraram o nível de 100% de mortalidade causada pelo isolado PIC 1. A mobilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 4 e 6 exsudatos de colônias de actinomicetos, dos 37 testados, em incubação por 24 e 48 horas em exsudato de colônia, respectivamente, comparada com aquela em água. Essa redução variou de 70% a 100%. Dois isolados reduziram a mobilidade ($P \leq 0,05$) em 100%, semelhante àquela ocorrida na solução de Temik. Os mesmos isolados que reduziram a mobilidade causaram também mortalidade a qual variou de 19% a 100%, quando os J2 foram expostos por 24 e 48 horas em exsudatos de colônias. Os isolados ALF 4 e QUI 4 produziram substâncias tóxicas a J2 em filtrado de cultura e em exsudato de colônia. A exposição dos J2 por 48 horas em exsudatos de colônias aumentou a mortalidade comparada àquela em 24 horas. Entre os 4 isolados que reduziram significativamente a eclosão total em exsudatos de colônias, o CAF 2 e ALF 2 tiveram sempre menor eclosão do que a testemunha em qualquer período de avaliação. Entretanto, o SOR 3 teve eclosão abaixo da testemunha apenas a partir do décimo dia de incubação. Nos demais isolados (QUI4, GOI 5 e BRA 4), a eclosão de J2 em exsudato de colônia foi sempre próxima da testemunha. A capacidade parasitária de actinomiceto em J2 de *M. javanica* foi estudada em 37 isolados cultivados em meio SCN e a suspensão de esporos colocada em areia, seguida da adição de J2. Noutro ensaio, dez isolados também cultivados em SCN foram testados, porém, os J2 foram adicionados nas colônias de cada isolado em placa de Petri. No terceiro ensaio, os isolados de actinomicetos foram cultivados em diferentes meios e a seguir procedeu-se ao teste de parasitismo. Dos isolados cultivados em SCN e testados em suspensão em água ou adicionados em areia na presença de J2 de *M. javanica* não se observou nenhum parasitismo. Entretanto, dos 10 isolados cultivados em diferentes meios observou-se parasitismo de J2 num deles (JOÁ 2) cultivado no meio com quitina (CCMS). Nesses J2, hifas foram

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

observadas na sua extremidade anterior, ocorrendo em 3% dos espécimens. Quando o isolado JOÁ 2 foi cultivado noutro meio sem quitina, não ocorreu o parasitismo. Foi a primeira vez que se observou o parasitismo de um fitonematóide por actinomiceto.

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

ABSTRACT

COIMBRA, J. L. Actinomycetes as agents of biological control of root-knot nematodes. 2003. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Sixty four actinomycetes isolates were obtained from rhizosphere of *Hibiscus esculentus* L. (okra), *Coffea arabica* L. (coffee), *Zea mays* L. (maize), *Sorghum bicolor* L. (sorghum), *Allium cepa* L. (onion), *Solanum gilo* Raddi, *Ricinus communis* L. (castor bean), *Allium sativum* L. (garlic), *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. DC. (cabbage), *Lactuca sativa* L. (lettuce), *Psidium guajava* L. (Guava), *Bromelia antiacantha* Bertol., *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Bidens pilosa* L., *Acanthospermum hispidum* DC, *Dichromena ciliata*, *Melissa officinalis* L., *Pennisetum purpureum* Schum. and *Brachiaria* sp. Such isolates were tested on the control of *M. javanica* in tomato in growth room. For that, seeds of tomato were immersed in each inoculum suspension, seeded in Plantmax substrate, irrigated with spores suspension of the same isolate and then, eggs of *M. javanica* were added. Thirty days later the number of galls, eggs and egg masses in each tomato seedling was estimated. Twenty eight, out of forty two tested isolates, accounted for 67% of the actinomycetes obtained from the rhizosphere of these obtained from crops, reduced ($P \leq 0,05$) the number of galls of *M. javanica* in tomato when compared to control. Seven isolates reduced ($P \leq 0,05$) the number of egg masses per root of tomato. However, none reduced the number of eggs per plant. Two isolates, CAF 5 and COU 3, obtained from coffee (*Coffea arabica* L.) rhizosphere and from *Brassica oleracea*, respectively, reduced simultaneously the number of galls and egg masses in tomato. Coffee was the crop from which most actinomycetes isolates were obtained, followed by *Brassica oleracea*. The percentage of isolates antagonistic to *M. javanica* was different among crops. Most antagonistics were encountered in coffee (24%) followed by *Brassica oleracea* (18%). Thirteen out of forty two isolates from crops, accounting for thirty one percent, promoted tomato growth by increasing dry matter. Two of them, CAF 5 and COU 10, obtained from rhizosphere of *Coffea arabica* and *Brassica oleracea*, besides promoting the plant growth reduced, also, the number of galls per tomato root. Among isolates obtained from rhizosphere of weeds and graminiculous plants actinomycetes were found with greater percentage of isolates from *Solanum sisymbriifolium* and *Melissa officinalis* rhizospheres. Ten isolates of actinomycetes from weeds and graminiculous plants reduced ($P \leq 0,05$) the

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

number of galls per gram of roots compared to control and accounted for 45% of the tested isolates. The reduction varied from 27 to 65%. The number of eggs per gram of root was reduced ($P \leq 0,05$) by four isolates among ten obtained from weeds and graminicolous plants which reduced also the galls numbers. The reduction varied from 13 to 44%. However the number of eggs masses was reduced ($P \leq 0,05$) by ten isolates from weeds and graminicolous plants, but six of them reduced also the number of galls, with the reduction varying from 33 to 81%. The isolates BRA 5, GRA 3 e PIC 1 obtained from *Brachiaria* sp., *Bromelia antiacantha* Bertol and *Bidens pilosa* L., respectively reduced ($P \leq 0,05$) simultaneously, the number of galls, egg and egg masses in tomato. Three isolates of actinomycetes obtained from graminicolous plants among eight tested, reduced, simultaneously, the number of galls and eggs of *M. javanica*. Among fourteen isolates obtained from weeds, seven of them reduced, simultaneously, the number of galls and eggs of *M. javanica*. Eight isolates of actinomycetes, among twenty two obtained from weeds and graminicolous plants and tested, increased ($P \leq 0,05$) the dry matter of tomato plants, representing thirty six of the tested isolates, and coincides with the isolates which also reduced ($P \leq 0,05$) the number of galls and/or eggs of *M. javanica*. In studies done with filtrates and colony exsudates, forty one actinomycetes isolates were cultivated, initially, in starch medium (SCN) and replicated to liquid medium of malt extract ISP2 (MYE) from where filtrates were obtained. Thirty seven isolates, after growing in SCN medium, were replicated to oat medium with agar from where the colony extracts were obtained. Eggs and second stage juveniles (J2) of *M. javanica* were incubated in filtrates, where actinomycetes were grown, or in solution prepared from colony exsudates of actinomycete grown in solide medium, and avaliated the hatching, mobility and mortality of J2. The J2 mobility was reduced ($P \leq 0,05$) by 15 from 41 actinomycetes filtrates tested compared to control where J2 was incubated in water or in MYED liquid medium. Ten of them reduced motility at same level ($P \leq 0,05$) as in the Temik solution filtrate. These reductions varied from 12 to 100%. However, the mortality of J2 was significant in 11 out of 41 filtrates tested, compared to control where J2 were incubated in water or in MYE liquid medium. Among filtrates that caused mortality only the ALF 4 caused 75%. All the others caused 100% equal to Temik solution. The filtrate which induced J2 mortality reduced, also, its mobility. But five filtrates which reduced mobility did not caused mortality. All filtrates tested reduced the J2 hatching compared to control, but similar ($P \leq 0,05$) to that in Temik solution. The isolates filtrates which affected hatching caused 75 to 100% J2 mortality. Filtrates dilutions of four most effective isolates on causing J2 mortality in previous assay, reduced

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

75 to 85% J2 mortality. However in the same dilutions, the mortality caused by the filtrate of the isolate PIC 1 was always 100%. The J2 mobility was reduced by four and six exsudate solutions of colonies isolates, among thirty seven tested, when incubated by 24 and 48 hours, respectively, compared to control. The reduction varied from 70 to 100%. Two isolates reduced mobility by 100% similar ($P \leq 0,05$) to that in Temik solution. The exsudates which reduced mobility caused also mortality. The mobility reduction varied from 19 to 100% when J2 was exposed by 24 and 48 hours. The isolates ALF 4 and QUI 4 produced toxic substances to J2, either in liquid medium (filtrate) as in colonies grown in solid medium. The exposure of J2 by 48 hours in colony exsudate increased mortality compared to 24 hours incubation. The colony exsudates of ALF 2, ALF 4, SOR 3 and CAF 2 isolates, among seven tested, reduced ($P \leq 0,05$) the total J2 hatching after fifteen days of incubation compared to control. These colony exsudates caused also mortality when incubated by 24 and 48 hours. However these toxicities did not occur when J2 was exposed to the filtrates of the same culture isolates. Except ALF 4 isolate all others tested reduced hatching at the second incubation day. Since then, the hatching curve progress among isolates varied greatly. Among four isolates that significantly reduced the total hatching the CAF 2 and ALF 2 isolates had always less hatching than control in any measured time period. However the SOR 3 isolate had less hatching than control only after ten days of incubation. All the other isolates (QUI 4, GOI 5 and BRA 4) the hatching was always close to control. The parasitism capacity of isolates of actinomycetes on J2 of *M. javanica* was studied in thirty seven isolates cultivated in SCN medium and the spore suspension obtained, was poured into glass tubes with sand followed by addition of J2 suspension. In another assay, eleven isolates, also cultivated in SCN medium, were tested, by adding J2 suspension onto colonies of each isolate in Petri dishes. In the third assay isolates of actinomycetes were cultivated in different media followed by parasitism test in J2. Parasitism of *M. javanica* J2 was not observed when isolates were cultivated in SCN medium regardless of the test in water or sand. However, when the isolates were previously, cultivated in different media, one isolate (JOÁ 2) among eleven tested, showed parasitism in J2 of *M. javanica* only when cultivated in CCMS medium. Hyphae were observed in the external part of the mouth region of the J2 in three percent of the specimens. This is the first time a parasitism of plant parasitic nematode by actinomycetes is observed.

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

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os grandes prejuízos causados por fitonematóides, que alcançam 12,3% da produção agrícola mundial, correspondendo a 100 bilhões de dólares (Sasser, 1989), justificam a busca de novas estratégias de controle desses fitopatógenos. Insere-se, nesse contexto, o controle biológico explorando beneficemente os inimigos naturais dos fitonematóides, os quais colonizam a rizosfera da planta onde também vive a maioria dos nematóides de maior importância econômica para as culturas. Dentre os habitantes da rizosfera antagonistas dos nematóides, os fungos têm sido os mais estudados, seguidos pelas bactérias (Kerry, 1987; Campos et al., 1998)

São várias as espécies fúngicas de reconhecido antagonismo a fitonematóides. Os mais pesquisados são *Arthrobotrys* spp, *Monacrosporium* spp, *Verticillium clamydosporium*, *Verticillium lecani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Catenaria* spp., entre outras, com formas diferentes de parasitismo nos nematóides desde a predação ao parasitismo de ovos (Morgan-Jones & Rodrigues-Kabana, 1985; Machado & Campos, 1997; Ribeiro & Campos, 1993). Conhece-se hoje o aspecto cosmopolita desses fungos, bem como o efeito na redução populacional de fitonematóides, principalmente em casa de vegetação (Campos, 1992).

Dentre as bactérias, a *Pasteuria penetrans*, as endofíticas e as rizobactérias têm sido muito estudadas (Campos et al., 1998).

Outro grupo de organismos com potencial no controle de fitonematóides é dos actinomicetos. Nas áreas de medicina e veterinária eles tem sido pesquisados na produção de metabólitos, alguns já explorados pela indústria, como os antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos (Melo & Azevedo, 1998). Os actinomicetos predominam em solos pobres em nutrientes, muito intemperizados como os de cerrado (Coelho & Drozdowicz, 1978), alcalinos ou

extremamente ácidos (Pereira, 1995), portanto, devem ser cosmopolitas e podem ter potencial no controle de fitonematóides. Alguns trabalhos têm demonstrado sua ação na redução populacional dos nematóides das galhas (*M. incognita*), *Radopholus similis* e *Pratylenchus penetrans* em casa de vegetação (Esnard et al., 1998; Samac & Kinkel, 2001). *Streptomyces costaricanus* incorporado ao solo reduziu a população de *Radopholus similis* e *Helicotylenchus multicinctus* em bananeira (Samac & Kinkel, 2001).

Tem-se também tentado explicar o modo de atuação do actinomiceto na redução populacional de nematóides. Park et al. (2002) demonstraram o parasitismo de *Streptoverticillium albireticuli* em *Caenorhabditis elegans*. Contudo, os trabalhos sobre antagonismo de actinomicetos aos fitonematóides ainda são escassos e inexistentes no Brasil. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, isolar actinomicetos da rizosfera de várias espécies de plantas, selecionar e identificar os isolados antagonistas aos nematóide das galhas. Além disso, buscou-se estudar o efeito de seus metabólitos nesses nematóides, bem como testar “in vitro” a capacidade de parasitismo de isolados em *M. javanica*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os actinomicetos são microorganismos gram positivos pertencentes à Ordem Actinomycetales, com crescimento filamentosso assemelhando-se a hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 μm (Gottlieb, 1973; Williams & Wellington, 1982). Em meio de cultura sólido, formam-se filamentos ramificados firmemente aderidos ao ágar, que crescem como micélio fúngico formando em sua extremidade esporos assexuados, dando à colônia a aparência característica, de algodão, veludo ou pó (Pereira, 1995). O gênero *Streptomyces* ocorre com freqüência em solos recém-arados e encharcados, onde produzem substâncias voláteis com cheiro rançoso característico, denominadas “geosmin”. Vinte gêneros já foram isolados de solo, sendo *Streptomyces* o gênero com 70% a 90% de ocorrência nas amostras analisadas, seguido de *Nocardia*, *Actinomyces* e *Micromonospora* (Siqueira & Franco, 1988).

É na rizosfera das plantas onde mais vêm sendo isolados actinomicetos antagonistas a fitopatógenos (Crawford et al., 1993; Fillinow & Lockwood, 1985). Isso, devido ao estímulo do exsudato radicular, que possui papel importante na população de microorganismos nesta região (Gesheva, 2001).

Segundo Melo (1998), poucos trabalhos têm explorado o uso de actinomicetos no controle biológico, apesar da enorme quantidade de metabólitos secundários produzidos por eles. Existem evidências sobre a sua importância na rizosfera, influenciando o crescimento das plantas por meio da sua ação no controle biológico de patógenos dessa região (Crawford et al., 1993). Espécies de *Streptomyces* e de outros gêneros de actinomicetos têm demonstrado eficácia na proteção de plantas contra fungos e bactérias fitopatogênicas, tanto em casa de vegetação como no campo (Fillinow & Lockwood, 1985; Reddi & Rao, 1971; Tu, 1986; Zuberer et al., 1988; Crawford et al., 1993).

2.1 Associação e antagonismo de actinomicetos a nematóides

Alguns trabalhos têm demonstrado a eficácia dos actinomicetos na redução da população de fitonematóides, principalmente os do gênero *Streptomyces*. Dicklow et al. (1993) avaliaram a eficiência de um isolado de *Streptomyces* designado “CR-43” em controlar o nematóide das galhas *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus penetrans*, em campo e em casa de vegetação. Esse isolado foi capaz de reduzir o número de galhas em raízes de pimenta, plantada em solo naturalmente infestado com *M. incognita* raça 3. Resultado semelhante foi obtido num segundo experimento usando tomateiro e pimenteira. Em ambos os experimentos, as populações de *R. reniformis* foram significativamente reduzidas pela aplicação do isolado “CR-43”, bem como a população de *Pratylenchus penetrans* em raízes de morango. Mais tarde, esse isolado foi identificado como *Streptomyces costaricanus* (Esnard et al., 1995). A infestação prévia do solo com trigo pré-incorporado com *S. costaricanus*, cultivado em meio líquido, também reduziu a população de *Radopholus similis* e de *Helicotylenchus multicinctus* (Esnard et al., 1998).

Jonathan et al. (2000) aplicaram isolados de actinomiceto no solo infestado por *M. incognita* e plantaram tomate e banana. Doze semanas após o plantio, constataram, em ambas as espécies de plantas, redução do número de galhas, número de ovos, bem como promoção do crescimento vegetativo comparado com a testemunha.

Krechel et al. (2002), após testarem isolados de actinomicetos do gênero *Streptomyces* obtidos da rizosfera da batateira, visando ao controle de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, observaram redução de 50% a 85% no número de galhas e de 40% a 100% no número de massa de ovos comparado com a testemunha. Nesse trabalho o isolado de actinomiceto mais promissor foi o *Streptomyces lavendulae*.

Isolados de *Streptomyces* eficientes em controlar, no campo, a sarna da batateira causada por *Streptomyces scabies* e em inibir, “in vitro”, o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas, também demonstraram capacidade na redução populacional de *Pratylenchus penetrans* em raízes de alfafa (Samac & Kinkel, 2001).

2.1.1 Efeito de metabólitos de actinomicetos sobre fitonematóides

Os actinomicetos são organismos conhecidos e bastante pesquisados pela sua ampla produção de metabólitos, dentre eles os antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos, com aplicações nas áreas de medicina, agricultura e veterinária (Melo & Azevedo, 1998). Grande parte desses metabólitos, principalmente os de efeito nematicida, é produzida por actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Sanglier et al., 1993; Melo, 1998). Avermectinas são lactonas macrocíclicas derivadas da fermentação do micélio de *Streptomyces avermitilis* com amplo espectro anti-helmíntico e inseticida, afetando principalmente os fitonematóides (Stretton et al., 1987). Existem quatro classes dessa macromolécula com efeito nematicida: avermectina A1, A2, B1 e B2, sendo as da série B as de maior efeito (Blackburn et al., 1996). Essas avermectinas e seus derivados semi-sintéticos são eficazes contra algumas espécies de nematóides em doses extremamente baixas, tendo um efeito nematicida até dez vezes superior ao “oxamil” e aldicarbe, no entanto, apresentando baixa toxicidade em mamíferos (Heisy et al., 1988; Garabedian & Van Gundy, 1983).

Vários trabalhos têm demonstrado os seus efeitos no controle dos nematóides *Meloidogyne incognita*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Tylenchorhynchus dubius* (Garabedian & Van Gundy, 1983; Sasser et al., 1982; Blackburn et al., 1996). Dicklow et al. (1993) demonstraram que metabólitos produzidos em meio líquido por espécies de *Streptomyces*

inibiram a reprodução de nematóides de vida livre da espécie *Caenorhabditis elegans* “in vitro” e também foram capazes de reduzir o número de galhas de *M. incognita* em raízes de tomateiro, quando incorporados ao solo. Walker et al. (1966), testando os filtrados de quatro isolados de *Streptomyces* sobre juvenis e adultos de *Pratylenchulus penetrans*, observaram que, após 24 horas de exposição, ocorreu 40% de mortalidade quando as culturas foram incubadas em temperaturas de 5°, 10° e 15°C e 15% de mortalidade quando os filtrados foram obtidos à temperatura de 25°C. Extratos de acetona obtidos de filtrados de seis isolados de *Streptomyces* demonstraram reduzir a motilidade de juvenis de *M. incognita* “in vitro” (Kazuyoshi et al., 2002).

Outros gêneros, além do *Streptomyces*, podem produzir metabólitos tóxicos a nematóides. Park et al. (2002) observaram que, após colocar uma suspensão contendo cinquenta nematóides de vida livre da espécie *C. elegans* em contato com o actinomiceto *Streptoverticillium albireticuli* cultivado em placas de Petri por 7 dias no meio FMEA, ocorreram 50% de nematóides imóveis após três horas de contato, aumentando para 90% após seis horas. Por outro lado, alguns filtrados de actinomicetos podem não ter efeito tóxico a nematóides, mas podem exercer forte atração orientando o nematóide em direção ao filtrado, como foi constatado por Katznelson & Henderson (1963) sobre *Aphelenchoides parietinus*.

No solo, a decomposição da quitina libera substâncias tóxicas a fitonematóides como a amônia, uma vez que essa macromolécula possui altos níveis de nitrogênio. Além da liberação de substâncias tóxicas, a quitina é substrato e fonte de energia para os actinomicetos, permitindo a esses organismos competir com mais eficiência com outros microorganismos do solo e da rizosfera. Vários trabalhos demonstraram o efeito da quitina em controlar nematóides fitoparasitas quando adicionada ao solo, devido, talvez, à sua decomposição por actinomicetos (Miller et al., 1973; Spiegel et al., 1987).

2.1.2 Relação de parasitismo ou associação entre actinomicetos e fitonematóides

Os primeiros relatos da associação entre actinomiceto e nematóides ocorreram em 1851, feitos por Leidy (Sayre & Starr, 1988). Naquela época, não se conhecia detalhadamente esse grupo de microorganismos, porém, o autor o descreveu como um procarioto filamentosos, concluindo que se tratava de um actinomiceto, provavelmente uma espécie do gênero *Streptomyces*. Esse mesmo gênero foi isolado do corpo dos nematóides *Ditylenchus triformis*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Heterodera glycines* (Dürschner, 1984; Walter & Kaplan, 1990; Nour et al., 2003). Actinomicetos também já foram isolados de cistos de *Heterodera trifolii* e de massa de ovos de *Tylenchulus semipenetrans* (Hay & Skipp, 1993; Walter & Kaplan, 1990). Park et al. (2002) descreveram o parasitismo do actinomiceto *Streptoverticillium albireticuli* ao nematóide de vida livre *C. elegans*, em um ensaio “in vitro”.

Segundo Park et al. (2002), enzimas conhecidamente produzidas pelos actinomicetos, como proteases, quitinases e lipases, podem auxiliar na destruição da cutícula dos nematóides e, conseqüentemente, possibilitar seu parasitismo nos nematóides. Miller & Sands (1977), testando os efeitos “in vitro” das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que após 24 horas houve modificações estruturais na cutícula do nematóide, devido a uma provável degradação enzimática. Enzimas como a quitinase têm sido relatadas por sua ação, principalmente na degradação de ovos de fitonematóides. Mercer et al. (1992) demonstraram que quitinases produzidas por *Streptomyces griseus* foram capazes de causar a eclosão prematura de juvenis de *Meloidogyne hapla*, devido à degradação da parede do ovo.

2.2 Métodos de isolamento e preservação de actinomicetos

O isolamento de actinomicetos é usualmente alcançado impondo-se uma pressão seletiva sobre todos os organismos que se encontram crescendo em meios de cultura com diferentes diluições do solo (Goodfellow & Willians, 1983). Essa seletividade pode ser feita pelo pré-tratamento da amostra com um fator de seleção, reduzindo assim o número de bactérias não filamentosas de crescimento rápido que afetam o crescimento dos actinomicetos. Esse fator pode ser o tratamento térmico o qual tem sido usado para isolamento das espécies dos gêneros *Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptomyces* e *Rhodococcus*.

A maioria das espécies de actinomicetos desenvolve-se lentamente em meio de cultura. O período de incubação pode variar de dez a quatorze dias à temperatura de 25° a 30°C. Normalmente, a temperatura de crescimento é de 25° a 30°C para as espécies mesofílicas e de 45° a 55°C para espécies termofílicas.

A seletividade em meio agarizado é obtida, essencialmente, pela adição de substâncias antifúngicas e de inibidoras bacterianas como alguns antibióticos. Antibióticos antifúngicos, como a ciclohexamida, micostatin, pimarcina ou anfotericina, bem como a “rosa de bengala”, usadas como bacteriostáticas, têm sido recomendados. Num meio contendo “rosa de bengala”, os actinomicetos são facilmente reconhecidos. Os meios de cultura rotineiramente usados para contagem e isolamento de actinomicetos do solo são: a) “SCN ágar” (amido, caseína, KNO₃, NaCl, K₂HPO₄, MgSO₄. 7H₂O, CaCl₂, FeSO₄ e ágar) com pH ajustado para 7,2 antes da autoclavagem (Küster & Williams, 1964), b) “RBSCN ágar”(SCN com “rosa de bengala”) pH ajustado variando de 7 a 7,2, c) “RBME ágar”(estrato de malte, K₂HPO₄ com “rosa de bengala” e ágar) pH ajustado variando de 6 a 6,2 (Ottow & Glathe, 1968), d) “CCMS ágar”(quitina coloidal, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄, ZnSO₄, MnCl₂, ágar) com o pH ajustado para 8, após a autoclavagem (Hsu & Lockwood, 1975). Crawford et al. (1993), visando

o isolamento de actinomicetos do solo antagonistas a *Pythium ultimum*, observaram que os meios "WYE" contendo extrato de levedura e ágar, e "YCED" constituído de ácido casamino, extrato de levedura, glicose e ágar, permitiram o isolamento de um grande número de actinomicetos do solo.


Espécies comuns de actinomicetos, como as pertencentes ao género *Streptomyces*, vêm sendo isoladas do solo, após o seu pré-tratamento com agentes físicos ou químicos, seguido de diluição e plaqueamento em meio específico. Entre os agentes de natureza química, pode ser citado o método de enriquecimento do solo seco com carbonato de cálcio, na proporção de 10:1, seguido da incubação do solo enriquecido a 26°C, durante um período de sete a nove dias em ambiente saturado com água (Tsao et al., 1960). A adição de quitina no solo também pode ser utilizada para o isolamento de espécies de *Streptomyces*, tendo efeito estimulante sobre a população de actinomicetos em detrimento da população fúngica (Williams & Mayfield, 1971).

Dentre os métodos físicos de pré-tratamento do solo, pode ser citado o tratamento térmico do solo a 40°-50°C, durante um período de duas a dezesseis horas, o qual reduz a flora bacteriana e favorece o isolamento de *Streptomyces* (Williams et al., 1972b). A centrifugação de uma suspensão de solo a 1600 g durante 20 minutos também pode ser utilizada para separar esporos de fungos e de bactérias dos demais, os quais ficam sedimentados. Em seguida, centrifuga-se o sobrenadante para obter-se os esporos de actinomicetos (Nüesch, 1965). Outro método físico consiste na diluição do solo em água e filtragem com membrana bacteriológica com poro de 0,3µ, seguida da incubação em meio agarizado, o que facilita o isolamento de actinomicetos que crescem entre os poros da membrana em direção ao meio de cultura, ficando os esporos fúngicos e bacterianos fora da tela (Trolldenier, 1966). Os fenóis, amônia, cloramina e hipoclorito de sódio também vêm sendo usados para o tratamento do solo, pois

reduzem a flora bacteriana e fúngica, facilitando assim o isolamento de *Streptomyces* (Lawrence, 1956; Burman et al., 1969).

Para espécies do gênero *Microtetraspora*, algumas estratégias de isolamento têm sido estabelecidas. Hayakawa et al. (1996) isolaram *Microtetraspora* por meio do pré-tratamento do solo com calor à temperatura de 110°C, por 1 hora, seguido da adição de cloreto de benzetonio a 0,05%. A suspensão pré-tratada foi espalhada em placas contendo o meio de cultura “LSV-SE ágar” (KCl, Na₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCO₃, FeSO₄, vitamina B e ágar) acrescido dos antibióticos kanamicina, norfloxacin e ácido nalixídico. Segundo os autores, a adição desses antibióticos, bem como o tratamento térmico, reduziu a ocorrência de bactérias não filamentosas e actinomicetos indesejáveis. *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium* e *Dactylosporangium* têm sido isolados em “HV ágar” (KCl, Na₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCO₃, FeSO₄, vitamina B e ágar em pH 7,2), fazendo-se inicialmente o pré-tratamento das amostras do solo com calor e agentes químicos como fenol, gluconato de clorhexidina e cloreto de benzotônio.

Visando selecionar actinomicetos antagonísticos para o controle biológico da galha da coroa em roseira incitada por *Agrobacterium tumefaciens*, Silva (1998) obteve 321 culturas de actinomicetos do solo. Para isso, amostras de solo sofreram pré-tratamento térmico a 70°C por 72 horas, inativando outros microorganismos competidores (Willians & Davies, 1965). Em seguida, 10g de solo foram agitados em 100 mL de solução salina (0,85% NaCl) por 1 hora e diluídos dez vezes em série. De cada diluição, 100 µL foram espalhados em placa de Petri, contendo meio extrato de solo (Pramer & Schmidt, 1964) e espalhados com o auxílio de alça de Drigalsky, conforme o método descrito por Korn-Wendisch & Kützner (1992). As placas foram, então, incubadas a 30°C, por até 14 dias. O meio de cultura à base de extrato de solo proposto por Pramer & Schmidt (1964) é composto de glicose, KNO₃, K₂HPO₄ e 100 ml de extrato,



para 900 ml de água destilada. Para a obtenção do extrato, adicionou-se a um recipiente com 300g de solo comum um volume de água de torneira, de modo a cobrir todo o solo e ter uma lâmina de água de 2 ou 3 cm. O conjunto foi levado ao aquecimento por 8 minutos até atingir a pré-fervura. Decorrido este intervalo de tempo, esperou-se a decantação das partículas sólidas e recolheu-se o extrato. Acrescentaram-se ao meio de extrato de solo os antibióticos cicloheximida e nistatina na concentração final de 100 ppm (Williams & Davies, 1965) e fenol a 0,7% (Lawrence, 1956).

O isolamento de actinomicetos do tecido interno das raízes visando à obtenção de espécies endofíticas também tem sido realizado. Sardi et al. (1992) isolaram algumas espécies endofíticas de *Streptomyces* das raízes de plantas de 28 espécies botânicas. Para isso, as raízes de 1 a 5 mm de diâmetro foram lavadas para remoção das partículas de solo e, em seguida, desinfestadas por meio da sua exposição em vapor de óxido de propileno por 1 hora. Pedacos de 1 cm foram incubados no meio "SCN ágar" proposto por Küster & Willians (1964) durante 21 dias a 25^oC. Moura (1996), visando isolar actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em tomate, obteve alguns isolados a partir de tecidos internos de raízes de tomateiro. Para isso, raízes de tomateiros saudáveis foram coletadas, lavadas em água corrente e esterilizadas superficialmente por cinco minutos em água sanitária comercial com princípio ativo variando de 2% a 2,3%. Em seguida, as raízes foram lavadas para a remoção do excesso de hipoclorito, seccionadas longitudinalmente, eliminando-se a camada mais externa e os fragmentos restantes transferidos para placas de Petri contendo o meio de extrato de solo (Pramer & Schmidt, 1964), mantendo-se a face interna em contato com o meio para isolamento.

Os métodos de conservação de isolados de actinomicetos podem ser assim enumerados: a) transferência serial, b) preservação em solo estéril, c)

preservação em “deep freezer” e d) nitrogênio líquido. O método de emulsificação em glicerol e conservação em “deep-freezer” tem permitido manter isolados de actinomicetos por um longo período de tempo sem o risco de contaminação (Willians & Wellington, 1982). Esse método consiste em armazenar esporos de actinomicetos em meio glicerol 10%, a uma temperatura de -20°C (Wellington & Willians, 1978). Outra técnica de conservação de actinomicetos consiste na liofilização, cuja metodologia foi descrita por Hopwood & Ferguson (1969).

2.3 Perspectivas do uso de actinomicetos no controle de fitonematóides

Os actinomicetos têm sido de interesse da pesquisa nas áreas de medicina, veterinária e agronomia devido, principalmente, à produção de metabólitos de interesse industrial como os antibióticos, enzimas, entre outros. Para isto, muitas técnicas têm sido desenvolvidas no isolamento, cultivo e preservação, conforme descrito anteriormente, as quais têm sido úteis também para os estudos sobre seu uso no controle de doenças fúngicas e bacterianas iniciados a partir da década de 1980, porém, ainda escassos.

A partir da década de 1990, iniciaram-se os estudos da associação de actinomicetos com fitonematóides por meio do isolamento desses organismos de massa de ovos e de cistos (Hay & Skipp, 1993; Walter & Kaplan, 1990). Também na década de 90, avançaram os estudos sobre as avermectinas produzidas por *Streptomyces avermitilis* no controle de fitonematóides e insetos (Stretton et al., 1987). Nos últimos dez anos, tem sido estudado o efeito de *Streptomyces costaricanus* no controle de várias espécies importantes de fitonematóides em várias culturas (Esnard et al., 1995; Esnard et al., 1998). Entretanto, ainda não se conhece o modo de ação dos actinomicetos nos fitonematóides. Park et al. (2002) descreveram o parasitismo de

Streptovercillium albireticuli em *Caenorhabditis elegans*. Esse nematóide se alimenta de bactérias e pode ter sido infectado pela ingestão desse actinomiceto.

Além da avermectina produzida pelo *Streptomyces avermitilis*, outros metabólitos produzidos por outros gêneros e espécies de actinomicetos ainda não têm sido estudados quanto à toxicidade a fitonematóides. Dessa forma, a partir de então, o modo de parasitismo, bem como o efeito de metabólitos, nos fitonematóides deve ser enfatizado nas pesquisas com actinomicetos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLACKBURN, K.; ALM, S. R.; YEH, T. S. Avermectin B1, izarfos, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. *Journal of Nematology*, Lawrence, v. 28, n. 4, p. 687-694, Dec. 1996. Supplement.

CAMPOS, V. P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 16, n. 172, p. 26-30, 1992.

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

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. *Révue D Ecologie et de Biologie du Sol*, Paris, v. 15, n. 4, p. 459-473, 1978.

CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, Nov. 1993.

DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMN, B. M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v. 19, n. 2, p. 159-173, Feb. 1993.

DÜRSCHNER, U. U. Observation on a new nematophagous actinomycete. *Proceeding Ist. Int. Congr. Nematol.*, Guelph, Canada, August, 1984, 23p.

ESNARD, J.; MARBAN-MENDONZA, N.; ZUCKERMAN, B. Effects of three microbial broth cultures and a organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. *European Journal of Plant Pathology*, Dublin, v. 104, n. 5, p. 457-463, July 1998.

ESNARD, J.; THOMAS, L. P.; ZUCKERMAN, B. *Streptomyces costaricanus* sp. nov. isolated from nematode-suppressive soil. *International Journal of Systematics Bacteriology*, Washington, v. 45, n. 4, p. 775-779, Oct. 1995.

- FILONOW, A. B.; LOCKWOOD, J. L. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biological control agents of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, n. 12, p. 1033-1036, Dec. 1985.
- GARABEDIAN, S.; VAN GUNDY, S. D. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. *Journal of Nematology*, Leiden, v. 15, n. 4 p. 503-510, Oct. 1983.
- GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *European Journal of Soil Biology*, Paris, v. 38, n. 1, p. 85-88, Feb. 2002.
- GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annual review of Microbiology*, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.
- GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the actinomycetales. In: SYRES, G.; SKINNER, F. A. *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. London: Academic Press, 1973. p. 1-10.
- HAY, F. S.; SKIPP, R. A. Fungi and actinomycetes associated with cyst of *Heterodera trifolii* Goffart (nematoda: Tylenchida) in pasture soils in new zealand. *Nematologica*, Leiden, v. 39, n. 3, p. 376-384, July 1993.
- HAYAKAWA, M.; MOMOSE, Y.; YAMAZAKI, T.; NONOMURA, H. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 80, n. 4, p. 375-386, Apr. 1996.
- HEISY, R. M.; MISHRA, S. K.; PUTNAM, A. R.; MILLER, J. R.; WHITENACK, C. J.; KELLER, J. E.; HUANG, J. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganism. In: HORACE, G. C. (Ed.). *Biological active natural products potential use in agriculture*. 1988. p. 483. (ACS Symposium Series)
- HOPWOOD, D. A.; FERGUNSON, H. M. A rapid method for lyophilising *Streptomyces* cultures. *Journal Applied of Bacteriology*, Oxford, v. 32, n. 4, p. 434-436, 1969.
- HSU, S. C.; LOCKWOOD, J. L. Powdered chitin as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, Washington, v. 29, n. 3, p. 422-426, 1975.

JONATHAN, E. L.; BARKER, K. R.; ABDEL-ALIM, F. F.; VRAIN, T. C.; DICKSON, D. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica*, Auburn, v. 30, n. 2, p. 231-240, Dec. 2000.

KATZNELSON, H.; HENDERSON, V. E. Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganism. *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v. 10, n. 1, p. 37-41, Jan. 1963.

KAZUYOSHI, C.; MAKOTO, F.; SHIGEAKI, F.; SENJI, T.; TADASHI, Y.; HIDEO, I.; TERUO, S.; AKIRA, N. Screening of actinomycetes with antinematodal properties. *Biocontrol-Science*, Oxford, v. 7, n. 1, p. 49-54, 2002.

KERRY, B. R. Biological Control. In: BROWN, R. H.; KERRY, B. R. *Principles and practice of nematode control in crops*. London: Academic Press, 1987. p. 233-263.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The family streptomycetaceae. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; SWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHULEIFER, K. H. (Ed.). *The prokaryotes*. New York: Springer Verlag, 1992. 1027 p.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v. 48, n. 9, p. 772-786, Sept. 2002

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for the isolation of streptomycetes. *Nature*, London, v. 202, n. 493, p. 928-929, 1964.

LAWRENCE, C. H. A method of isolation of actinomycetes from scab potato tissue and soil with minimal contamination. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 34, n. 1, p. 44-47, Jan. 1956.

MACHADO, V. O. F.; CAMPOS, V. P. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação da eficiência no controle de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 3, p. 387-391, set. 1997.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle biológico*. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MERCER, C. F.; GREENWOOD, D. R.; GRANT, J. L. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood (nematoda: tylenchida). *Nematologica*, Leiden, v. 38, n. 2, p. 227-236, Apr. 1992.

MILLER, P. M.; SANDS, D. C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, Raleigh, v. 9, n. 3, p. 192-197, 1977.

MILLER, P. M.; SANDS, D. C.; RICH, S. Effect of industrial mycelial residue, wood fiber waste, and chitin on plant parasitic nematodes and some soil borne diseases. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, v. 57, n. 5, p. 438-442, May 1973.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KABANA, R. Phytonematode pathology: fungal modes of action a perspective. *Nematropica*, Alabama, v. 15, n. 1, p. 107-114, June 1985.

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

NOUR, S. M.; LAWRENCE, J. R.; ZHU, H.; SWERHONE, G. D. W.; WELSH, M.; WELACKY, T. W.; TOPP, E. Bacteria associated with cyst of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 1, p. 607-615, Jan. 2003.

OTTOW, J. C. G.; GLATHE, H. Rose bengal-malt extract agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Applied Microbiology*, Washington, v. 16, n. 1, p. 170-171, 1968.

PARK, J. O.; EL-TARABILY, K. A.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 35, n. 5, p. 361-365, Nov. 2002.

- PEREIRA, J. C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrado**. 1995. 172 p. Tese (Doutorado em Solos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.
- PRAMER, D.; SCHIMIDT, E. L. Bacteria and actinomycetes by the dilution plate method. In: ----. **Experimental soil microbiology**. Minnesota: Burgess, 1964. p. 35-37.
- REDDI, G. S.; RAO, A. S. Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi. **Indian Phytopatology**, Alligarh, v. 24, n. 4, p. 649-657, Dec. 1971.
- RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento “in vitro” de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. no sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 132-139, 1993.
- SAMAC, D. A.; KINKEL, L. L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfafa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 1, p. 35-44, 2001.
- SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T. A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, Paris, v. 144, n. 8, p. 633-642, Oct. 1993.
- SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONOV, G. E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2691-2693, Aug. 1992.
- SASSER, J. N. **Plant-parasitic nematodes: the farmer hidden enemy**. Raleigh: North Carolina University Graphics, 1989. 115 p.
- SASSER, J. N.; KIRKPATRICK, T. L.; DYBAS, R. A. Efficacy of avermectins for root-knot control in tobacco. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 8, p. 691-693, Aug. 1982.
- SAYRE, R. M.; STARR, M. P. Bacterial diseases and antagonism of nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 69-101.

- SILVA, H. S. A. **Seleção de actinomicetos antagonísticos para o controle biológico da galha bacteriana da roseira incitada por *Agrobacterium tumefaciens***. 1998. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- SIQUEIRA, J.; FRANCO, A. A. **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 1988. 235 p. (Programa de ciências agrárias nos trópicos brasileiros)
- SPIEGEL, Y.; CHET, L.; COHN, E. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes II. Mode of action. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 98. n. 3, p. 337-345, 1987.
- STRETTON, A. O. W.; CAMPBELL, W. C.; BABU, J. R. Biological activity and mode of action of avermectins. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. **Vistas on nematology: a commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists**. Hyattsville: Society of Nematology, 1987. p. 136-146.
- TSAO, P. H.; LEBEN, C.; KEITT, G. W. An enrichment method for isolating actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, n. 1, p. 88-89, Jan. 1960.
- TU, J. C. Hyperparasitism of *Streptomyces albus* on a destructive mycoparasite *Nectria inventa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 117, n. 1, p. 71-76, Sept. 1986.
- WALKER, J. T.; SPECHT, C. H.; BEKKER, J. F. Nematocidal activity to *Pratylenchus penetrans* by culture fluids from actinomycetes and bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 12, n. 2, p. 347-351, 1966.
- WALTER, D. E.; KAPLAN, D. T. Antagonism of plant-parasitic nematodes in florida citrus. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 22, n. 4, p. 567-573, Oct. 1990.
- WELLINGTON, E. M. H.; WILLIAMS, S. T. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. **Microbios Letters**, Cambridge, v. 6, n. 23/24, p. 151-157, 1978.
- WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 38, n. 2, p. 251-261, 1965.

WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L.; MAYFIELD, C.I.; KHAN, M.R. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. II. The ph requirements of streptomycetes from two acid soils. *Soil Biology & Biochemistry*, Great Britain, v.3, p.187-195,1971.

WILLIAMS, S. T.; SHAMEEMULLAH, M.; WATSON, E.T.; MAYFIELD, C.I. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology & Biochemistry*, Great Britain, v.4, p.215-225, 1972.

WILLIAMS, S. T.; WELLINGTON, E. M. H. Actinomycetes. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). *Methods of soil analysis*. 2. ed. Madison: ASA/SSSA, 1982. p. 964-987. (ASA. Agronomy, n. 9)

ZUBERER, D. A.; KERNERLEY, C. M.; JEGER, M. J. Populations of bacterial actinomycetes associated with sclerotica of *Phymatotrichum omnivorum* buried in houston black clay. *Plant Soil*, Dordrecht, v. 112, n. 1, p. 69-76, Nov. 1988.

CAPÍTULO 2

**EFEITO ANTAGÔNICO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE
DIFERENTES CULTURAS NA FORMAÇÃO DE GALHAS E NA
REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO**

RESUMO

COIMBRA, J. L. Efeito antagônico de actinomiceto isolado de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. In: _____. **Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas**. 2003. Cap. 2, p. 22-39. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foram obtidos 42 isolados de actinomicetos a partir da rizosfera das seguintes culturas: *Hibiscus esculentus* L. (quiabeiro), *Coffea arabica* L. (cafeeiro), *Zea mays* L. (milho), *Sorghum bicolor* L. (sorgo), *Allium cepa* L. (cebola), *Solanum gilo* Raddi (jiló), *Ricinus communis* L. (mamona), *Allium sativum* L. (alho), *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. (couve), *Lactuca sativa* L. (alface) e *Psidium guajava* L. (goiabeira). Esses isolados foram testados no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro em sala climatizada. Para isto, sementes de tomate foram microbiolizadas na suspensão de cada isolado, semeadas em substrato Plantmax, irrigadas com suspensão de esporos do mesmo isolado e adicionados ovos de *M. javanica*. Trinta dias após, contou-se o número de galhas, ovos e de massa de ovos em cada muda de tomate. Vinte e oito, dos 42 isolados testados, representando 67% dos actinomicetos obtidos da rizosfera de diferentes culturas, reduziram ($P \leq 0,05$) o número de galhas de *M. javanica* em tomateiro quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide. Sete isolados reduziram ($P \leq 0,05$) o número de massa de ovos por grama de raiz do tomateiro, porém, nenhum deles reduziu o número de ovos/g de raiz. Dois isolados, o CAF 5 e o COU 3 obtidos da rizosfera do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e da couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), respectivamente, reduziram concomitantemente o número de galhas e de massa de ovos/g de raiz do tomateiro. A cultura em que mais se isolaram actinomicetos foi a do cafeeiro, com 10 isolados, seguida do quiabeiro com 7 e couve com 6. Nas demais culturas, o número de isolados obtidos variou de 1 a 4. No entanto, a porcentagem de isolados antagonistas obtidos da rizosfera de cada cultura foi diferente, com destaque para o cafeeiro, com 24% e a couve, com 18%. Treze dos 42 isolados, representando 31%, promoveram o crescimento do tomateiro aumentando a matéria seca. Coincidentemente, dois deles, isto é, CAF 5 e COU 10, obtidos da rizosfera do café e da couve, respectivamente, além de promover o crescimento, reduziram o número de galhas/g de raiz do tomateiro.

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

ABSTRACT

COIMBRA, J. L. Antagonic effect of actinomycetes isolated from cultivated plants in the formation of galls and reproduction of *Meloidogyne javanica* in tomato. In: _____. *Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas*. 2003. Cap. 2, p. 22-39. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Forty two actinomycetes isolates were obtained from rhizosphere of *Hibiscus esculentus* L. (okra), *Coffea arabica* L. (coffee), *Zea mays* L. (maize), *Sorghum bicolor* L. (sorghum), *Allium cepa* L. (onion), *Solanum gilo* Raddi, *Ricinus communis* L. (castor bean), *Allium sativum* L. (garlic), *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. D.C. (cabbage), *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Psidium guajava* L. (Guava). Such isolates were tested on the control of *M. javanica* in tomato in growth room. For that, seeds of tomato were immersed in each inoculum suspension, seeded in Plantnax substrate, irrigated with spores suspension of the same isolated and then eggs of *M. javanica* were added. Thirty days later the number of galls, eggs and egg masses in each tomato seedling was estimated. Twenty eight, out of forty two tested isolates, accounting for 67% of the actinomycetes obtained from the rhizosphere of the different crops, reduced ($P \leq 0,05$) the number of galls of *M. javanica* in tomato when compared to control. Seven isolates reduced ($P \leq 0,05$) the number of egg masses per root of tomato. However, none reduced the number of eggs for plant. Two isolates, CAF 5 and COU 3, obtained from coffee (*Coffea arabica* L.) rhizosphere and from *Brassica oleracea*, respectively, reduced simultaneously the number of galls and egg masses in tomato. Coffee was the crop from which most actinomycetes isolates were obtained, followed by *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. D.C. The percentage of isolates antagonistic to *M. javanica* was different among crops. Most antagonistic were encountered in coffee (24%) followed by *Brassica oleracea* (18%). Thirteen out of forty two isolates, accounting for thirty one percent, promoted tomato growth by increasing dry matter. Two of them, CAF 5 and COU 10, obtained from rhizosphere of *Coffea arabica* and *Brassica oleracea*, besides promoting the plant growth reduced, also, the number of galls per tomato root.

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

1 INTRODUÇÃO

Actinomicetos constituem um grupo de microorganismos de interesse industrial, pois seus metabólitos já são comercializados como enzimas, antibióticos e inibidores enzimáticos (Melo & Azevedo, 1988). As avermectinas produzidas pelo actinomiceto *Streptomyces avermitilis* têm formulações para o controle de insetos e de vermes de bovinos (Stretton et al., 1987). Na fitopatologia, a avermectina tem formulação para o controle de fitonematóides (Blackburn et al., 1996).

Actinomicetos antagonistas a fitobactérias e a doenças causadas por fungos têm sido encontrados (Filnow & Lockwood, 1985; Reddi & Rao, 1971; Tu, 1986; Zuberer et al., 1988; Crawford et al., 1993), principalmente na rizosfera das plantas onde recebem o estímulo dos exsudatos (Gesheva, 2002; Crawford et al., 1993).

Existem evidências sobre o papel dos actinomicetos na rizosfera, promovendo o crescimento de plantas por meio da sua ação inibidora de patógenos nessa região (Crawford et al., 1993). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos sobre o controle biológico de fitopatógenos com o uso de actinomicetos, apesar das vantagens, como resistência à dessecação e capacidade de produção de metabólitos secundários (Sanglier et al., 1993).

Alguns trabalhos demonstraram o potencial dos actinomicetos como agentes do controle biológico de fitonematóides (Esnard et al., 1998; Jonathan et al., 2000). No Brasil, entretanto, pesquisas sobre o antagonismo de actinomicetos a fitonematóides não têm sido realizadas, apesar desses organismos predominarem em solos pobres em nutrientes e muito intemperizados (Coelho & Drozdowicz, 1978), como os do cerrado e também em solos alcalinos ou extremamente ácidos de muitas regiões brasileiras (Pereira, 1995) com potencial para uma possível associação antagonista a

fitonematóides nessas áreas agricultáveis. Desta forma, objetivou-se neste trabalho avaliar, em sala climatizada, o potencial de actinomicetos isolados da rizosfera de diversas plantas no controle de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, em tomateiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Actinomicetos foram isolados da rizosfera de diversas culturas colhidas em diferentes localidades de Lavras, MG e região. Optou-se por isolar actinomicetos da rizosfera, por tratar-se de uma região propícia para o crescimento de microorganismos, aumentando as chances de encontrar antagonistas a fitonematóides. No isolamento, utilizaram-se os métodos de Tsao et al. (1960) e Korn-Wendisch & Kützner (1992), com algumas modificações. Para tanto, as raízes obtidas no campo foram colocadas sobre papel alumínio e deixadas para secar durante 24 horas à temperatura ambiente, para se coletar o solo rizosférico. Dez gramas desse solo foram misturados a um grama de carbonato de cálcio (CaCO_3) e umedecidos com 3 mL de água destilada esterilizada numa placa de Petri. Essa placa foi fechada e incubada a 26°C , por 10 dias. Após esse período, o solo enriquecido com carbonato de cálcio foi transferido para frasco de vidro estéril com 90 mL de água destilada esterilizada e agitado em agitador orbital durante 30 minutos, a 140 rpm. A seguir, em capela de fluxo laminar, procedeu-se à diluição em série da suspensão obtida em água destilada esterilizada, com fator de diluição de 1:10 até 10^{-5} . Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-3} a 10^{-5} , as quais foram distribuídas e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio de amido (SCN) de Küster & Williams (1964) com a seguinte composição: amido solúvel (10g), caseína (0,3g), KNO_3 (2g), NaCl (2g), K_2HPO_4 (2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,05g), CaCl_2 e $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (traços) e pH ajustado antes da autoclavagem para 7,2. As placas foram, então, incubadas à 26°C durante 30 dias em câmara de crescimento (BOD). Durante esse período, as colônias de actinomicetos que apareceram foram repicadas assepticamente em câmara de fluxo laminar para placas de Petri contendo o meio de amido. Sete

dias após, as placas com as colônias foram armazenadas em câmara fria a 10°C, até a utilização nos ensaios.

Alternativamente, visando evitar perdas de isolados, esses foram transferidos assepticamente para tubos criogênicos estéreis contendo solução de glicerol 10% e os frascos colocados em freezer à -20°C, conforme recomendação de Wellington & Williams (1978).

Foram testados 42 isolados de actinomicetos em bandejas de poliestireno com 72 células contendo o substrato orgânico Plantmax, em câmara climatizada. Para isto, colônias de actinomicetos isoladas de solo rizosférico e preservadas em freezer à -20°C como descrito anteriormente, foram repicadas com auxílio de uma alça de platina para placas de Petri contendo o meio SCN e incubadas a 26°C em câmara de crescimento. Após 7 dias, foram preparadas as suspensões de esporos. Para isso, adicionou-se água destilada nas placas e com auxílio de um bastão de vidro, raspou-se a superfície coletando-se os esporos num becker de 50 mL. Duas gotas de Tween 80 foram adicionadas à suspensão de esporos para facilitar a dispersão. Em seguida, foram quantificados no hemacitômetro de "Newbauer" e a concentração foi ajustada para 3×10^7 esporos/mL.

Para inoculação, sementes de tomateiro cv Santa Cruz Kada foram imersas na suspensão de esporos dos isolados por 15 minutos e semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato orgânico Plantmax. Quatro sementes foram colocadas por célula adicionando-se, em seguida, um mL da suspensão de esporos ao substrato. Sete dias, após a semeadura, foi feito o desbaste, deixando-se uma plântula de tomate por célula.

Quinze dias após a semeadura do tomate inocularam-se 400 ovos de *Meloidogyne javanica*, obtidos de tomateiros adultos e da soja pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981), por célula.

Para isto foram feitos dois orifícios próximo ao colo da planta em lados opostos com bastão de vidro e derramado 1 mL da suspensão com pipeta automática.

O experimento foi conduzido em sala climatizada e montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições sendo cada repetição constituída por duas plantas.

Trinta dias após a inoculação dos ovos de *Meloidogyne javanica*, fez-se a avaliação do experimento. Cada planta foi retirada cuidadosamente dos tubetes e cortada na altura do coleto para separar a parte aérea das raízes. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa a 80°C. A secagem foi feita por 24 horas e, após o resfriamento, foi pesada em balança eletrônica, obtendo-se o peso da matéria seca. As raízes foram separadas do substrato em água parada e estimado o número de galhas. A seguir, foram imersas em solução de floxina B a 0,015% durante 20 minutos, de forma a facilitar a visualização das massas de ovos, as quais foram contadas juntamente com as galhas empregando-se contador manual e lupa. Todo o sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5 cm de comprimento, extraídos ovos pela técnica de Hussey & Barker (1973) e quantificados.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Scott & Knott (Scott & Knott, 1974) a 5% de significância, após transformação em $\sqrt{x + 0.5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vinte e oito, dos 42 isolados testados, representando 67% dos actinomicetos obtidos da rizosfera de diferentes culturas (Tabela 1), reduziram ($P \leq 0,05$) o número de galhas de *M. javanica* em tomateiro quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide. Sete isolados reduziram ($P \leq 0,05$) o número de massa de ovos por grama de raiz do tomateiro, porém nenhum deles reduziu o número de ovos/g de raiz (Tabela 2). Dois isolados, o CAF 5 e o COU 3, obtidos da rizosfera do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e da couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.), respectivamente, reduziram ($P \leq 0,05$) concomitantemente o número de galhas e de massa de ovos/g de raiz do tomateiro.

Jonathan et al. (2000) encontraram menor número de galhas de *M. incognita* quando inocularam em tomateiro dois isolados de actinomicetos comparados com a testemunha com inoculação apenas do nematóide, cuja redução variou de 69% a 75%. Também encontraram redução de 52% a 64% do número de galhas de *M. incognita* e de 84% no número de ovos por bananeira com os mesmos actinomicetos. Noutro trabalho, Dicklow et al. (1993) observaram em casa de vegetação que um isolado de *Streptomyces* obtido de um solo supressivo a nematóide, mais tarde identificado como *Streptomyces costaricanus*, foi capaz de reduzir em até 70% o número de galhas em raízes de tomateiro causada por *Meloidogyne incognita*. Em trabalho realizado no campo com a cultura da pimenta, esse actinomiceto foi capaz de reduzir o número de galhas de *M. incognita* quando comparado com a testemunha, embora não tenha havido diferença estatística. Outras espécies do gênero *Streptomyces* também demonstraram efeito na redução do número de galhas em plantas atacadas por *Meloidogyne*.

Plantas hospedeiras	Locais de coleta	Nº isolados/	Código
Quiabeiro	Ritápolis (Ramos)	7	(QUI 1-7)
(<i>Hibiscus esculentus</i> L.)			
Cafeteiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA),	10	(CAF 1-10)
	Ritápolis (Ramos)		
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	1	(MIL 1)
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	3	(SOR 1-3)
Cebola (<i>Allium cepa</i> L.)	Bom Sucesso	1	(CEB 1)
Jiló (<i>Solanum gilo</i> Radddi)	Ritápolis (Ramos)	2	(JIL 1-2)
Mamona	Lavras (Campus da UFLA),	4	(MAM 1-4)
	Bom Sucesso		
(<i>Ricinus communis</i> L.)			
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	Ritápolis, Bom Sucesso	3	(ALH 1-3)
Couve (<i>Brassica oleracea</i> L.)	Ritápolis (Ramos)	6	(COU 1-6)
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	3	(ALF 1-3)
Goiabeira (<i>Psidium guajava</i> L.)	Bom Sucesso	1	(GOI 1)
Tomate	Lavras (Campus da UFLA)	1	(TOM 1)
(<i>Lycopersicon esculentum</i> L.)			
Total		42	

TABELA 1 Isolados de actinomicetos obtidos de solo rizosférico de diferentes culturas amostradas em Lavras, MG e região.

Krechel et al. (2002), após testarem isolados de actinomicetos do género *Streptomyces* obtidos da rizosfera da batateira visando ao controle de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, observaram redução no número de galhas e de massa de ovos variando, respectivamente, entre 50% a 85% e entre 40% a 100%, quando comparados com a testemunha. Nesse trabalho, o isolado de actinomiceto mais promissor foi o *Streptomyces lavendulae*.

TABELA 2 Efeito dos isolados de actinomicetos isolados da rizosfera de diferentes culturas no número de galhas, ovos e massa de ovos/g de raiz do tomateiro.

Isolado	Galhas/g de raiz		Massa de ovos/g de raiz		Ovos/g de raiz	
	Número	% de redução	Número	% de redução	Número	% de redução
TEST	259 c	-	169 c	-	5414 e	-
ALF 3	100 g	61	85 d	50	9558 d	0
COU 8	116 g	55	114 c	0	37120 a	0
CAF 2	117 g	55	100 d	41	4965 e	0
CAF 5	119 g	54	106 d	37	4320 e	0
SOR 1	135 f	48	167 c	0	23475 b	0
CAF 8	144 f	44	139 c	0	125606 d	0
COU 1	145 f	44	164 c	0	4716 e	0
ALF 4	145 f	44	133 c	0	11062 d	0
QUI 4	146 f	44	180 b	0	14984 c	0
SOR 2	148 f	43	122 c	0	4958 e	0
SOR 3	151 f	42	137 c	0	26023 b	0
COU 10	154 f	41	133 c	0	3422 e	0
QUI 3	159 e	39	123 c	0	20025 c	0
CAF 1	161 e	38	160 c	0	12609 d	0
MAM 3	167 e	36	139 c	0	21829 b	0
JIL 5	169 e	35	151 c	0	21977 b	0
ALH 3	173 e	33	151 c	0	10321 d	0
ALF 2	183 e	29	197 b	0	24437 b	0
CAF 10	188 e	27	129 c	0	5874 e	0
TOM 1	188 e	27	117 c	0	8853 d	0
ALH 1	194 e	25	63 d	63	11942 d	0
COU 3	195 e	25	99 d	41	7230 e	0
QUI 7	195 e	25	151 c	0	15086 c	0
CAF 7	208 e	20	125 c	0	6771 e	0
CAF 4	211 d	19	156 c	0	4240 e	0
QUI 6	213 d	18	229 b	0	15882 c	0
QUI 5	216 d	17	219 b	0	24932 b	0
COU 6	220 d	15	265 a	0	28339 b	0
CAF 6	241 c	0	160 c	0	6426 e	0
MAM 5	246 c	0	219 b	0	28126 b	0

Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

“...Continua....”

"TABELA 2, Cont."

Isolado	Galhas/g de raiz		Massa de ovos/g de raiz		Ovos/g de raiz	
	Número	% de redução	Número	% de redução	Número	% de redução
CAF 3	248 c	0	198 b	0	12981 d	0
COU 2	256 c	0	254 a	0	26295 b	0
JIL 4	257 c	0	250 a	0	25607 b	0
GOI 5	272 b	0	201 b	0	5526 e	0
MAM 4	276 b	0	230 b	0	22807 b	0
QUI 8	278 b	0	238 a	0	26384 b	0
CAF 9	287 b	0	218 b	0	5376 e	0
ALH 6	299 b	0	52 d	69	6825 e	0
MAM 1	303 b	0	64 d	62	8193 d	0
MIL 1	307 b	0	286 a	0	23104 b	0
CEB 1	341 a	0	220 b	0	10736 d	0
QUI 2	366 a	0	256 a	0	27699 b	0

Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A cultura em que mais se isolaram actinomicetos foi a do cafeeiro, com 10 isolados seguida do quiabeiro, com 7 e couve, com 6 (Tabela 1). Nas demais culturas, o número de isolados obtidos variou de 1 a 4 (Tabela 1). No entanto, a porcentagem de isolados antagonistas obtidos da rizosfera de cada cultura foi diferente, com destaque para o cafeeiro, com 24% e a couve, com 17% (Figura 1).

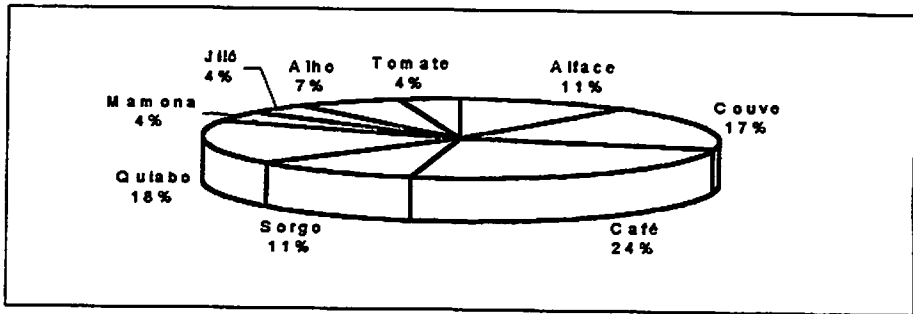


FIGURA 1 Porcentagem de isolados de actinomicetos antagonistas a *Meloidogyne javanica* isolados de plantas cultivadas.

Gesheva (2001), comparando o número de isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera do limoeiro e da laranjeira, observou que a rizosfera da laranjeira permitiu obter maior número de espécies de actinomicetos, demonstrando a influência da planta na população de actinomicetos da rizosfera. Vários trabalhos vêm demonstrando a importância da rizosfera como fonte no isolamento de actinomicetos antagonistas a fitopatógenos (Crawford et al., 1993; Fillinow & Lockwood, 1985).

Treze dos 42 isolados testados, representando 31%, promoveram o crescimento do tomateiro aumentando a matéria seca (Tabela 3). Coincidentemente, dois deles, isto é, CAF 5 e COU 10, obtidos da rizosfera do café e da couve, respectivamente, além de promover o crescimento, reduziram também o número de galhas/g de raiz do tomateiro.

TABELA 3 Efeito de isolados de actinomicetos da rizosfera de diferentes culturas no peso da matéria seca do tomateiro, infestados ou não com *Meloidogyne javanica*.

Isolado	Matéria seca (g)	
	Peso total	% de aumento
TEST (NI)	0,22 c	-
TEST (N)	0,21 c	-
ALF 3	0,16 d	0
COU 8	0,16 d	0
CAF 2	0,21 c	0
CAF 5	0,31 a	47
SOR 1	0,09 e	0
CAF 8	0,29 a	38
COU 1	0,22 c	0
ALF 4	0,28 b	33
QUI 4	0,19 c	0
SOR 2	0,30 a	43
SOR 3	0,24 c	0
COU 10	0,26 b	24

Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade (NI=testemunha não inoculada, N = inoculada)

“...Continua...”

“TABELA 3, Cont.”

Isolado	Matéria seca (g)	
	Peso total	% de aumento
QUI 3	0,20 c	0
CAF 1	0,22 c	0
MAM 3	0,10 e	0
JIL 5	0,24 c	0
ALH 3	0,26 b	24
ALF 2	0,08 e	0
CAF 10	0,22 c	0
TOM 1	0,28 b	33
ALH 1	0,20 c	0
COU 3	0,27 b	29
QUI 7	0,26 b	24
CAF 7	0,27 b	29
CAF 4	0,17 d	0
QUI 6	0,18 d	0
QUI 5	0,10 e	0
COU 6	0,20 c	0
CAF 6	0,18 d	0
MAM 5	0,11 e	0
CAF 3	0,25 b	19
COU 2	0,09 e	0
JIL 4	0,13 e	0
GOI 5	0,27 b	29
MAM 4	0,17 d	0
QUI 8	0,21 c	0
CAF 9	0,18 d	0
ALH 6	0,13 e	0
MAM 1	0,15 d	0
MIL 1	0,16 d	0
CEB 1	0,17 d	0
QUI 2	0,25 b	19

Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade

Jonathan et al. (2000), após testarem dois isolados de actinomicetos em tomateiro e bananeira, visando ao controle de *Meloidogyne incognita*, observaram que, além de controlar o nematóide, houve um aumento do crescimento da planta. Noutro trabalho, Esnard et al. (1998) visando ao controle de *Radopholus similis* e *Helicotylenchus multicinctus* em bananeira, observaram que o actinomiceto *Streptomyces costaricanus* aumentou o crescimento da planta, além de proporcionar um bom controle dos nematóides. O mesmo efeito foi observado quando simultaneamente se inocularam o actinomiceto com *Bacillus thuringiensis* e *Paecilomyces marquandii*, talvez causado pela produção de substâncias promotoras de crescimento pelo actinomiceto. Fitohormônios, como auxinas, produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* e por *Bacillus*, têm sido encontrados na rizosfera de plantas (Boroninin et al., 1993). Entretanto, a antibiose talvez seja o principal modo de ação dos actinomicetos na promoção do crescimento vegetativos do tomateiro, pois são eficientes produtores de antibióticos (Melo, 1998). A produção de metabólitos de efeito nematostático ou nematocida pelos isolados de actinomicetos pode ter proporcionado a redução da infectividade do nematóide nas raízes do tomateiro, favorecendo o desenvolvimento da planta.

4 CONCLUSÕES

1 Sessenta e sete por cento dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* às raízes do tomateiro.

2 Vinte e nove por cento dos isolados de actinomicetos aumentaram a matéria seca do tomateiro.

3 A maior percentagem de isolados de actinomicetos que demonstraram controlar o nematóide foi obtida da rizosfera do cafeeiro e quiabeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.

BORONIN, A. M.; KOCHETKOV, V. V.; DUBEIKOVSKY, A. N.; MORDUKHOVA, E. A. Biological cont. rol of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in russia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., 1993, Montreal, Canada, 1993. p. 276.

BLACKBURN, K.; ALM, S. R.; YEH, T. S. Avermectin B1, izafos, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 28, n. 4, p. 687-694, Dec. 1996. Supplement.

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Révue D Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v. 15, n. 4, p. 459-473, 1978.

CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, Nov. 1993.

DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B. M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 2, p. 159-173, Feb. 1993.

ESNARD, J.; MARBAN-MENDONZA, N.; ZUCKERMAN, B. Effects of three microbial broth cultures and a organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v. 104, n. 5, p. 457-463, July 1998.

FILONOW, A. B.; LOCKWOOD, J. L. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biological control agents of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 12, p. 1033-1036, Dec. 1985.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 38, n. 1, p. 85-88, Feb. 2002.

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. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.

JONATHAN, E. L.; BARKER, K. R.; ABDEL-ALIM, F. F.; VRAIN, T. C.; DICKSON, D. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematopica**, Auburn, v. 30, n. 2, p. 231-240, Dec. 2000.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The family streptomycetaceae. In: BALOWS, A; TRUPER, H. G; SWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHULEIFER, K. H. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1992. 1027 p.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v. 48, n. 9, p. 772-786, Sept. 2002

KÜSTER, E.; WILLIAMS S. T. Selection of media for the isolation of streptomycetes. **Nature**, London, v. 202, n. 493, p. 928-929, 1964.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

PEREIRA, J. C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrado**. 1995. 172 p. Tese (Doutorado em Solos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

REDDI, G. S.; RAO, A. S. Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi. **Indian Phytopatology**, Alligarh, v. 24, n. 4, p. 649-657, Dec. 1971.

SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T. A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research Microbiology**, Paris, v. 144, n. 8, p. 633-642, Oct. 1993.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

STRETTON, A. O. W.; CAMPBELL, W. C.; BABU, J. R. Biological activity and mode of action of avermectins. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. **Vistas on nematology: a commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists**. Hyattsville: Society of Nematology, 1987. p. 136-146.

TSAO, P. H.; LEBEN, C.; KEITT, G. W. An enrichment method for isolating actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 50, n. 1, p. 88-89, Jan. 1960.

TU, J. C. Hyperparasitism of *Streptomyces albus* on a destructive mycoparasite *Nectria inventa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 117, n. 1, p. 71-76, Sept. 1986.

WELLINGTON, E. M. H.; WILLIAMS, S. T. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. **Microbios Letters**, Cambridge, v. 6. n. 23/24, p. 151-157, 1978

ZUBERER, D. A.; KERNERLEY, C. M.; JEGER, M. J. Populations of bacterial actinomycetes associated with sclerotica of *Phymatotrichum omnivorum* buried in houston black clay. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 112, n. 1, p. 69-76, Nov. 1988.

CAPÍTULO 3

EFEITO ANTAGÔNICO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE ERVAS DANINHAS E GRAMÍNEAS NA FORMAÇÃO DE GALHAS E NA REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO

RESUMO

COIMBRA, J.L. Efeito antagônico de actinomicetos isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro In: _____. Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas. 2003. Cap. 3, p. 41-56. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foram obtidos 22 isolados de actinomicetos a partir da rizosfera de plantas daninhas e de gramíneas das seguintes espécies: *Bromelia antiacantha* Bertol. (gravatá), *Solanum sisymbriifolium* Lam. (joá bravo), *Bidens pilosa* L. (picão preto), *Acanthospermum hispidum* DC (carrapicho de carneiro), *Dichromena ciliata* (capim-estrela), *Melissa officinalis* L. (melissa), *Pennisetum purpureum* Schum. (capim-elefante) e *Brachiaria* sp. (brachiaria). Esses isolados foram testados no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro em sala climatizada. Para isto, sementes de tomate foram microbiolizadas na suspensão de cada isolado, semeadas em substrato Plantmax, irrigadas com suspensão de esporos do mesmo isolado e adicionados ovos de *M. javanica*. Trinta dias após, contou-se o número de galhas, ovos e de massa de ovos em cada muda de tomate. Na rizosfera de todas as plantas amostradas encontraram-se actinomicetos com maior porcentagem de isolados em *Solanum sisymbriifolium* Lam. (joá bravo) e *Melissa officinalis* L. (melissa). Cerca de dez isolados de actinomicetos testados reduziram significativamente o número de galhas por grama de raiz quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide, representando 45% dos isolados testados. As reduções no número de galhas por grama de raiz variaram de 27% a 65%. O número de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) por quatro isolados dos dez que reduziram também o número de galhas comparados com a testemunha inoculada apenas com nematóide, com reduções que variaram de 13% a 44%. Contudo, o número de massa de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) em dez isolados de actinomicetos testados, sendo que 6 deles também reduziram o número de galhas, comparados com a testemunha. As reduções variaram de 33% a 81%. Os isolados BRA 5, GRA 3 e PIC 1, obtidos de brachiaria (*Brachiaria* sp.), gravatá (*Bromelia antiacantha* Bertol.) e picão preto (*Bidens pilosa* L.), respectivamente, diminuíram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e ovos por planta de tomate. Três isolados de actinomicetos obtidos de gramíneas, entre os oito testados demonstraram antagonismo a *M. javanica*, reduzindo galhas e de ovos/g de raiz do tomateiro. Entre os 14 isolados obtidos

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

de ervas daninhas, 7 reduziram galhas e o ovos/g de raiz. Oito isolados de actinomicetos, dentre os 22 testados ($P \leq 0,05$) aumentaram a matéria seca do tomateiro representando 36% dos isolados estudados e coincidentemente todos eles reduziram também o número de galhas e ovos de *M. javanica*.

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

ABSTRACT

COIMBRA, J.L. Antagonic effect of actinomycetes isolated from weeds plants and graminiculous plant on the gall formation and reproduction of *Meloidogyne javanica* in tomato. In:____. **Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas**. 2003. Cap. 3, p. 41-56. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Twenty two isolates of actinomycetes were obtained from rhizosphere of weeds and graminiculous plants like:*Bromelia antiacantha* Bertol., *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Bidens pilosa* L., *Acanthospermum hispidum* DC., *Dichromena ciliata*, *Melissa officinalis* L., *Pennisetum purpureum* Schum. and *Brachiaria* sp. Such isolates were tested on the control of *M. javanica* in tomato in growth room. For that, seeds of tomato were imersed in each inoculum suspension, seeded in Plantmax substract, irrigated with espores suspension of the same isolated and then added eggs of *M. javanica*. Thirty days latter the number of galls, eggs and egg masses in each tomato seedling was estimated. In each rhizosphere of the sampled plants, actinomycetes were found with greater percentage of isolates from *Solanum sisymbriifolium* Lam. and *Melissa officinalis* L. rhizospheres. Ten isolates of actinomycetes reduced ($P \leq 0,05$) the number of galls per gram of roots compared to control accounting for 45% of the tested isolates. The reduction varied from 27 to 65%. The number of eggs per gram of root was reduced ($P \leq 0,05$) by four isolates among the ten the which, also, reduced the gall numbers. The reduction varied from 13 to 44%. However, the number of egg masses was reduced ($P \leq 0,05$) by ten isolates, among them, six also reduced the number of galls, with reduction varing from 33 to 81%. The isolates BRA 5, GRA 3 and PIC 1 obtainned from *Brachiaria* sp., *Bromelia antiacantha* Bertol. and *Bidens pilosa* L., respectvelly, reduced ($P \leq 0,05$) simultaneously, the number of galls, egg and egg masses in tomato. Three isolates of actinomycetes obtainned from graminiculous plants, among eight tested, reduced, simultaneously, the number of galls and eggs of *M. javanica*. Among fourteen isolates obtainned from weeds seven of them reduced, simultaneously, the number of galls and eggs of *M. javanica*. Eight isolates of actinomycetes, among twenty two tested, increased ($P \leq 0,05$) the dry matter of tomato plants accounted for thirty six of the tested isolates and coincides with the isolates which also reduced ($P \leq 0,05$) the number of galls and/or eggs of *M. javanica*.

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

1 INTRODUÇÃO

O controle biológico tem explorado beneficemente os inimigos naturais de fitonematóides, principalmente aqueles que colonizam a rizosfera da planta onde também vive a maioria dos nematóides de importância econômica para as culturas. Dentre os habitantes da rizosfera antagonistas a nematóides, os fungos têm sido os mais estudados, seguidos das bactérias (Campos et al., 1998; Crawford et al., 1993; Fillinow & Lockwood, 1985; Iktin & Adenkunle, 1990; El-abyad et al., 1993).

Os actinomicetos são também residentes da rizosfera, de onde têm sido isolados por muitos pesquisadores (Miller et al., 1990), ocorrendo em solos pobres onde se adaptou, cuja escassez de nutrientes diminui a pressão de competidores (Alexander, 1977). Alguns isolados têm comprovada eficácia na diminuição de doenças do sistema radicular como aquelas causadas por *Sclerotinia minor*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum* e *Agrobacterium tumefaciens* (El-Tarabily et al., 2000; Murray, 1987; Wood, 1951; El-Abyad & El-Batanoiny, 1993). Isolados de actinomicetos têm sido eficazes na redução de galhas causadas por nematóides e na sua reprodução (Dicklow et al., 1993; Esnard et al., 1998; Jonathan et al., 2000).

Na rizosfera, os actinomicetos têm seu crescimento estimulado por exsudatos (Rovira, 1965), os quais têm composição diferentes entre as plantas (Gesheva, 2002). Portanto, a flora de actinomicetos pode variar com as diferentes rizosferas. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar a ocorrência de actinomicetos em rizosfera de diferentes ervas daninhas e de gramíneas e seus efeitos antagônicos a *Meloidogyne javanica* em tomateiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Actinomicetos foram isolados a partir de amostras de solo ao redor das raízes de diversas espécies de ervas daninhas e de gramíneas colhidas em diferentes localidades de Lavras, MG e região. No isolamento utilizaram-se os métodos de Tsao et al. (1960) e de Korn-Wendisch & Kützner (1992) com algumas modificações. Para tanto, as raízes colhidas no campo foram colocadas sobre papel alumínio e deixadas para secar durante 24 horas à temperatura ambiente, para se coletar o solo rizosférico. Dez gramas desse solo foram misturados a um grama de carbonato de cálcio e a mistura umedecida com 3 mL de água destilada esterilizada numa placa de Petri. Essa placa foi fechada e incubada a 26°C, por 10 dias. Após esse período, o solo enriquecido com carbonato de cálcio (CaCO₃), foi transferido para frasco de vidro estéril com 90 mL de água destilada esterilizada e agitado em agitador orbital durante 30 minutos a 140 rpm. A seguir, em capela de fluxo laminar, procedeu-se a diluição em série da suspensão obtida em água destilada esterilizada, com fator de diluição de 1:10 até 10⁻⁵. Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻³ a 10⁻⁵, as quais foram distribuídas e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio de amido (SCN) de Küster & Williams (1964) com a seguinte composição: amido solúvel (10g), caseína (0,3g), KNO₃ (2g), NaCl (2g), K₂HPO₄ (2g), MgSO₄ · 7 H₂O (0,05g), CaCl₂ e FeSO₄ · 7 H₂O (traços) e pH ajustado antes da autoclavagem para 7,2. As placas foram, então, incubadas a 26°C durante 30 dias em câmara de crescimento (BOD).

Durante esse período, as colônias de actinomicetos que apareceram foram repicadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, para placas de Petri contendo o meio SCN. Sete dias após, as placas com as colônias foram armazenadas em câmara fria a 10°C, até a utilização nos ensaios. Alternativamente, visando evitar perdas de isolados, esses foram transferidos

asépticamente para tubos criogênicos estéreis contendo solução de glicerol 10% e os frascos colocados em freezer a -20°C, conforme recomendação de Wellington & Williams (1978).

Foram testados 22 isolados de actinomicetos em bandejas de poliestireno com 72 células contendo o substrato orgânico Plantmax, em câmara climatizada. Para isto, colônias de actinomicetos isoladas de solo rizosférico e preservadas em freezer a -20°C, como descrito anteriormente, foram repicadas com auxílio de uma alça de platina para placas de Petri contendo o meio SCN e incubadas a 26°C em câmara de crescimento. Após 7 dias, foram preparadas suspensões de esporos dos isolados. Para isso, adicionou-se água destilada nas placas e, com auxílio de um bastão de vidro, raspou-se a superfície coletando-se os esporos num becker de 50 ml. Duas gotas de Tween 80 foram adicionadas à suspensão de esporos para facilitar a dispersão dos mesmos. Em seguida, foram quantificados no hemacitômetro de “Newbauer” e a concentração foi ajustada para 3×10^7 esporos/mL.

Para inoculação, sementes de tomateiro cv Santa Cruz Kada foram imersas na suspensão de esporos por 15 minutos e semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células contendo substrato orgânico Plantmax. Quatro sementes foram colocadas por célula, adicionando-se, em seguida, um mL da suspensão de esporos no substrato. Sete dias após a semeadura, foi feito o desbaste, deixando-se uma plântula de tomate por célula.

Quinze dias após a semeadura do tomate, inocularam-se 400 ovos de *Meloidogyne javanica* obtidos de tomateiros adultos e da soja pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981), por célula. Para isto, foram feitos dois orifícios próximo ao colo da planta em lados opostos com bastão de vidro e derramado 500 µL da suspensão de ovos por orifício com pipeta automática.

O experimento foi conduzido em sala climatizada e montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições sendo cada repetição constituída por duas plantas.

Trinta dias após a inoculação dos ovos de *Meloidogyne javanica*, fez-se a avaliação do experimento. Cada planta foi retirada cuidadosamente dos tubetes e cortada na altura do coleto para separar a parte aérea das raízes. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa a 80°C. A secagem foi feita por 24 horas e, após o resfriamento, foi pesada em balança eletrônica. As raízes foram separadas do substrato em água parada e estimado o número de galhas. A seguir foram imersas em solução de floxina B a 0,015% durante 20 minutos, de forma a facilitar a visualização das massas de ovos, as quais foram contadas juntamente com as galhas empregando-se contador manual e lupa. Todo o sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5 cm de comprimento, extraídos ovos pela técnica de Hussey & Barker (1973) e quantificados.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Scott & Knott (Scott & Knott, 1974) a nível de 5% de significância, após transformação em $\sqrt{x + 0.5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas rizosferas das plantas amostradas encontraram-se actinomicetos (Tabela 1) com maior porcentagem de isolados em *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Joá bravo) e *Melissa officinalis* L. (melissa) (Figura 1). Cerca de dez desses actinomicetos isolados reduziram significativamente o número de galhas por grama de raiz de tomate quando comparados com a testemunha inoculada apenas com o nematóide representando 45% dos isolados testados (Tabelas 1 e 2). As reduções no número de galhas por grama de raiz variaram de 27% a 65% (Tabela 2). O número de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) por quatro isolados dos dez que reduziram também o número de galhas, comparado com a testemunha inoculada apenas com nematóide, com reduções que variaram de 13% a 44% (Tabela 2). Contudo, o número de massa de ovos por grama de raiz foi reduzido ($P \leq 0,05$) em dez isolados de actinomicetos testados, sendo que 6 deles também reduziram o número de galhas, comparados com a testemunha. As reduções variaram de 33% a 81% (Tabela 2). Os isolados BRA 5, GRA 3 e PIC 1, obtidos de braquiária (*Brachiaria* sp.), gravatá (*Bromelia antiacantha* Bertol.) e de picão preto (*Bidens pilosa* L.), respectivamente, diminuíram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e ovos por planta de tomate. Três isolados de actinomicetos obtidos de gramíneas, entre os oito testados, demonstraram antagonismo a *M. javanica*, reduzindo galhas e ovos/g de raiz do tomateiro. Entre os 14 isolados obtidos de ervas daninhas, 7 reduziram galhas e o ovos/g de raiz (Tabela 2).

Actinomicetos antagonistas a nematóides parecem ocorrer na rizosfera tanto de gramíneas como de ervas daninhas, com predominância, talvez, entre as ervas daninhas (Tabela 2), demonstrando a importâncias dessas plantas na manutenção da flora de actinomicetos antagonista a nematóides e talvez de outros fitopatógenos (Krechel, 2002; Crawford et al., 1993; Rangaswami &

Vasantharjan, 1962; Toussaint et al., 1997). Habe (1997) demonstrou que rizobactérias isoladas da rizosfera de espécies de plantas nativas do cerrado e de invasoras da família das solanáceas foram eficientes no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 em casa de vegetação. Jonathan et al. (2000) relataram reduções no número de galhas e de ovos por planta de tomateiro atacada por *Meloidogyne javanica* quando inoculada com isolados de actinomicetos. As reduções foram de 69% a 75% no número de galhas/g e de 94% no número de ovos /planta. Noutro trabalho, Dicklow et al. (1993) encontraram redução de 70% no número de galhas causadas por *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro.

Oito isolados de actinomicetos, dentre os 22 testados ($P \leq 0,05$), aumentaram a matéria seca do tomateiro, representando 36% dos isolados estudados (Tabela 3). Coincidentemente, todos eles reduziram também o número de galhas e de ovos de *M. javanica* (Tabela 2).

TABELA 1 Isolados de actinomicetos obtidos de solo rizosférico de ervas daninhas e de gramíneas.

Plantas hospedeiras	Locais de coleta	Isolados
Gravatá (<i>Bromelia antiacantha</i>)	Ritápolis (Ramos)	3 (GRA 1-3)
Joá bravo (<i>Solanum sisymbriifolium</i>)	Ritápolis (Ramos)	3 (JOÁ 1-3)
Picão preto (<i>Bidens pilosa</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	2 (PIC 1-2)
Carrapicho-de-carneiro (<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.)	Lavras (Campus da UFLA)	1 (CAR 1)
Capim-estrela (<i>Dichromena ciliata</i>)	Lavras (Campus da UFLA)	2 (CES 1-2)
Melissa (<i>Melissa officinalis</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	5 (MEL 1-5)
Braquiária (<i>Brachiaria</i> sp.)	Lavras (Campus da UFLA)	5 (BRA 1-5)
Capim elefante (<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.)	Lavras (Campus da UFLA)	1 (CEL 1)
Total		22

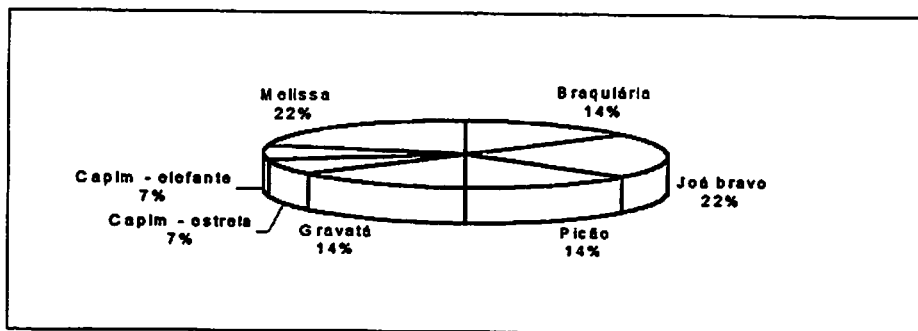


FIGURA 1 Porcentagem de isolados de actinomicetos antagônicos a *Meloidogyne javanica* isolados de cada planta daninha ou gramínea.

Esse aumento da matéria seca pode ter sido causado pela produção de substâncias promotoras de crescimento que podem ter induzido resistência a *M. javanica*. No entanto, o efeito direto na população de nematóides pode estar também envolvido nessa promoção do crescimento, pois metabólitos produzidos por actinomicetos podem ter proporcionado a redução da infectividade do nematóide nas raízes do tomateiro, favorecendo o desenvolvimento da planta. Jonathan et al. (2000) demonstraram aumento no crescimento de plantas de tomate inoculadas por dois isolados de actinomicetos. *Streptomyces costaricanus* misturado com grãos de trigo no solo também proporcionou aumento no crescimento da bananeira além de controlar *Radopholus similis* e *Helicotylenchus multicinctus* (Esnard et al., 1998).

Esses resultados, além de demonstrar a importância do actinomiceto na rizosfera como agente do controle de *M. javanica*, demonstram também o papel da rizosfera de plantas daninhas e de gramíneas na manutenção dos actinomicetos antagonistas a nematóides. Entretanto, avanços precisam ser

alcançados na metodologia de inoculação, bem como nos estudos de associação de actinomicetos com a rizosfera de várias plantas de interesse econômico.

TABELA 2 Efeito de isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de ervas daninhas e de gramíneas no número de galhas, ovos e massa de ovos de *Meloidogyne javanica* em tomateiro.

Isolado	Galhas/g de raiz		Massa de ovos/g de raiz		Ovos/g de raiz	
	Número	% de redução	Número	% de redução	Número	% de redução
TEST	259 c	-	169 c	-	5414 c	-
BRA 5	91 e	65	78 d	54	3625 d	18
JOÁ 3	93 e	64	145 c	0	6027 c	0
PIC 4	94 e	64	108 d	36	18364 b	0
GRA 3	110 e	58	89 d	47	4732 d	13
PIC 1	117 e	55	113 d	33	3042 d	44
GRA 1	127 e	51	137 c	0	4113 d	24
BRA 1	172 d	34	163 c	0	19624 b	0
CES 2	178 d	31	106 d	37	6482 c	0
JOÁ 2	183 d	29	81 d	52	6012 c	0
MEL 5	189 d	27	180 c	0	24185 a	0
CAR 1	207 c	0	161 c	0	16130 b	0
CEL 1	227 c	0	32 e	81	9211 c	0
MEL 1	230 c	0	46 e	73	16435 b	0
MEL 3	244 c	0	173 c	0	19915 b	0
GRA 2	247 c	0	203 c	0	17643 b	0
BRA 3	256 c	0	224 b	0	7980 c	0
CES 1	304 b	0	295 a	0	28678 a	0
MEL 4	307 b	0	289 a	0	13423 b	0
BRA 2	322 b	0	209 c	0	13659 b	0
BRA 4	380 a	0	168 c	0	8190 c	0
MEL 2	380 a	0	84 d	50	6667 c	0
JOÁ 1	404 a	0	90 d	47	18309 b	0

Médias seguidas por letras distintas em coluna diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

TABELA 3 Efeito de isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de ervas daninhas e de gramíneas no peso da matéria seca do tomateiro infestado ou não com *Meloidogyne javanica*.

Isolado	Matéria seca (g)	
	Peso total	% de aumento
TEST (NI)	0,22 c	-
TEST (N)	0,21 c	-
BRA 5	0,33 a	57
JOÁ 3	0,28 b	33
PIC 4	0,34 a	62
GRA 3	0,28 b	33
PIC 1	0,32 a	52
GRA 1	0,29 b	38
BRA 1	0,11 e	0
CES 2	0,28 b	33
JOÁ 2	0,27 b	29
MEL 5	0,17 d	0
CAR 1	0,19 d	0
CEL 1	0,17 d	0
MEL 1	0,16 e	0
MEL 3	0,13 e	0
GRA 2	0,18 d	0
BRA 3	0,21 c	0
CES 1	0,19 d	0
MEL 4	0,21 c	0
BRA 2	0,21 c	0
BRA 4	0,13 e	0
MEL 2	0,14 e	0
JOÁ 1	0,13 e	0

Médias seguidas por letras distintas em colunas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade

NI= testemunha não inoculada

N =testemunha inoculada

4 CONCLUSÕES

1 Quarenta e cinco por cento dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* às raízes do tomateiro.

2 Quatro isolados de actinomiceto dos 45% que reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* às raízes do tomateiro também reduziram a sua reprodução.

3 Trinta e seis por cento dos isolados de actinomicetos aumentaram a matéria seca do tomateiro.

4 A maior percentagem de isolados de actinomicetos que demonstraram controlar *M. javanica* foi obtida da rizosfera da *Melissa officinalis* L. (melissa) e *Solanum sisymbriifolium* Lam.(joá bravo).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley, 1977. 467 p.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.
- CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1998. p. 285-327.
- CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, Nov. 1993.
- DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B. M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 2, p. 159-173, Feb. 1993.
- ESNARD, J.; MARBAN-MENDONZA, N.; ZUCKERMAN, B. Effects of three microbial broth cultures and a organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v. 104, n. 5, p. 457-463, July 1998.
- EL-ABYAD, M. S.; EL-BATANOINY, N. H. Inhibitory effects of uv mutants of *Streptomyces corchorusii* and *Streptomyces spiroverticillatus* on bean and banana wilt pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, n. 8, p. 1080-1086, Aug. 1993.
- EL-ABYAD, M. S.; EL-SAYED, M. A.; EL-SHANSHOURY, ., EL-SABBAGH, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 2, p. 185-195, Feb. 1993.
- EL-TARABILY, K. A.; SOLIMAN, M. H.; NASAR, A. H.; AL-HASSANI, H. A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENA, F.; HARDY, J. Biological control

of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, Cambridge, v. 49, n. 5, p. 573-583, Oct. 2000.

FILONOW, A. B.; LOCKWOOD, J. L. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biological control agents of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 12, p. 1033-1036, Dec. 1985.

GESHEVA, V. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 38, n. 1, p. 85-88, Feb. 2002.

HABE, M. H. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas – RPCP- no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro. 1997. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade de Brasília, Brasília, DF.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.

IKOTIN, I.; ADENKUNLE, F. Inhibition of growth of some antagonistic microorganisms isolated from soils, **Journal Basic of Microbiology**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 95-98, 1990.

JONATHAN E. L.; BARKER, K. R.; ABDEL-ALIM, F. F.; VRAIN, T. C.; DICKSON, D. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Auburn, v. 30, n. 2, p. 231-240, Dec. 2000.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The family streptomycetaceae. In: BALOWS, A; TRUPER, H. G.; SWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHULEIFER, K. H. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1992. 1027 p.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v. 48, n. 9, p. 772-786, Sept. 2002

KÜSTER, E.; WILLIAMS S. T. Selection of media for the isolation of streptomycetes. *Nature*, London, v. 202, n. 493, p. 928-929, 1964.

MILLER, H. J.; LILJEROTH, E.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J. A. Fluctuation in rhizosphere and rhizoplane pseudomonad and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v. 36, n. 4, p. 254-258, Apr. 1990.

MURRAY, D. I. L. Rhizosphere microorganism from the jarroth forest of western australia and their effect on vegetative growth and sporulation of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botanic*, Collington, v. 35, n. 5, p. 567-580, 1987.

RANGASWAMI, E.; VASANTHAARJAN, V. N. Studies on the rhizosphere microflora of citrus trees. Fungal and actinomycete flora of the rhiizosphere. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 8, p. 485-489, 1962.

ROVIRA, A. D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review Microbiology*, Palo Alto, v. 19, p. 241-266, 1965.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

TOUSSAINT, V.; VALOUS, D.; DODIER, M. M.; FAUCHER, E.; DERY, C.; BRZEZINSKY, R.; RUEST, L.; BEALIEU, C. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi* the causal agent of raspberry roots rot. *Phytoprotection*, Quebec, v. 78, n. 2, p. 43-51, Aug. 1997.

TSAO, P. H.; LEBEN, C.; KEITT, G. W. An enrichment method for isolating actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 50, n. 1, p. 88-89, Jan. 1960.

WELLINGTON, E. M. H.; WILLIAMS, S. T. Preservation of actinomycetes inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters*, Cambridge, v. 6, n. 23/24, p. 151-157, 1978

WOOD, R. K. S. The control of diseases of lecttuce by the use of antagonistic microorganism. II. The control of *Rhizoctonia solani*. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v. 38, n. 1, p. 217, 1951.

CAPÍTULO 4

EFEITO DE EXSUDATOS DE COLÔNIAS E DE FILTRADOS DE CULTURAS DE ACTINOMICETOS NA ECLOSÃO, MOBILIDADE E MORTALIDADE DE JUVENIS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE *Meloidogyne javanica*

RESUMO

COIMBRA, J.L. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. In: _____. **Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas**. 2003. Cap. 4, p. 58-85. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Quarenta e um isolados de actinomicetos foram cultivados inicialmente em meio de amido (SCN) e repicados para o meio líquido de extrato de malte ISP2 (MYE) de onde obtiveram-se os filtrados. Trinta e sete isolados após o crescimento em SCN foram repicados para meio de aveia com ágar de onde foram obtidos os exsudatos de colônias. Ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram incubados em filtrado de meio de cultura onde cresceram actinomicetos ou em solução obtida de colônias desenvolvidas em meio sólido e avaliadas a eclosão, mobilidade e mortalidade. A motilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 15 dos 41 filtrados testados comparada com as testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou no meio líquido MYE. Dez deles reduziram ($P \leq 0,05$) a motilidade ao nível da solução de Temik. Essas reduções variaram de 12% a 100%. Contudo, a mortalidade de J2 foi significativa em 11 dos 41 filtrados testados, comparada às testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou no meio líquido. Dos filtrados de isolados que causaram mortalidade, apenas o ALF 4 causou 75%, os demais causaram 100%, semelhantes ($P \leq 0,05$) àquele nível em que os J2 foram incubados em solução de Temik. A mortalidade de J2 ocorreu sempre quando houve redução na motilidade, entretanto, em 5 filtrados que causaram imobilidade não ocorreu mortalidade. Todos os 7 filtrados testados reduziram significativamente a eclosão de J2 de *M. javanica*, comparados com as testemunhas em que o J2 foi incubado em água ou em meio líquido MYE, porém, semelhantes ($P \leq 0,05$) àquela em solução de Temik. Esses mesmos isolados causaram 75% a 100% de mortalidade de J2 em ensaio anterior. Diluições em 1:1 e 1:2 de filtrados de 4 culturas de actinomicetos reduziram em aproximadamente 75% a 85% a mortalidade de J2, respectivamente. Contudo, essas mesmas diluições não alteraram o nível de 100% de mortalidade causada pelo isolado PIC 1. A mobilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 4 e 6 exsudatos de colônias de actinomicetos, dos 37 testados, em incubação por 24 e 48 horas, respectivamente, comparada com aquela em água. Essa redução variou de 70% a 100%. Dois isolados reduziram a mobilidade em 100%, semelhante ($P \leq 0,05$)

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

àquela ocorrida na solução de Temik. Os mesmos exsudatos de isolados que reduziram a mobilidade causaram também mortalidade, a qual variou de 19% a 100% quando os J2 foram expostos por 24 e 48 horas, respectivamente. Os isolados ALF 4 e QUI 4 produziram substâncias tóxicas a J2 em filtrado de cultura e em exsudato de colônia. A exposição dos J2 por 48 horas aumentou a mortalidade, comparada àquela em 24 horas. Entre os 4 isolados que reduziram significativamente a eclosão total, o CAF 2 e ALF 2 tiveram sempre menor eclosão do que a testemunha em qualquer período de avaliação. Entretanto, o SOR 3 teve eclosão abaixo da testemunha apenas a partir do 10 dia de incubação. Nos demais isolados (QUI4, GOI 5 e BRA 4), a eclosão de J2 foi sempre próxima da testemunha.

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

ABSTRACT

COIMBRA, J.L. Effect of colony exudates and culture filtrates of actinomycetes on hatching, mobility and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*. In: _____. Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas. 2003. Cap. 4, p. 58-85. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Fourty one actinomycetes isolates were cultivated, initially, in starch medium (SCN) and replicated to liquid medium of malt extract ISP2 (MYE) from where filtrates were obtained. Thirty seven isolates, after growing in SCN medium, were replicated to oat medium with agar from where the colony extracts were obtained. Eggs and second stage juveniles (J2) of *M. javanica* were incubated in filtrates, where actinomycetes were grown, or in solution prepared from colony exsudates of actinomycetes grown in solide medium, and avaliated the hatching, mobility and mortality of J2. The J2 mobility was reduced ($P \leq 0,05$) by 15 out of 41 actinomycetes filtrates tested compared to control where J2 was incubated in water or in MYE liquid medium. Ten of them reduced motility at same level ($P \leq 0,05$) as in the Temik solution These reductions varied from 12 to 100%. However, the mortality of J2 was significant in 11 out of 41 filtrates tested, compared to control where J2 were incubated in water or in MYE liquid medium. Among filtrates that caused mortality only the ALF 4 caused 75%. All the others caused 100% equal to Temik solution. The filtrate which induced J2 mortality reduced, also, its mobility. But five filtrates which reduced mobility did not caused mortality. All filtrates of isolates tested reduced the J2 hatching compared to control, but similar ($P \leq 0,05$) to that in Temik solution. The isolates which affected hatching caused 75 to 100% J2 mortality. Filtrates dilutions of four most effective isolates on causing J2 mortality in previous assay, reduced 75 to 85% J2 mortality. However in the same dilutions, the mortality caused by the filtrate of the isolate PIC 1 was always 100%. The J2 mobility was reduced by four and six exsudate solutions of colonys isolates, among thirty seven tested, when incubated by 24 and 48 hourd, respectvelly, compared to control. The reduction varied from 70 to 100%. Two isolates reduced mobility by 100% similar ($P \leq 0,05$) to that in Temik solution. The exsudate which reduced mobility caused also mortality. The mobility reduction varied from 19 to 100% when J2 was exposed by 24 and 48 hours. The isolates ALF 4 and QUI 4 produced toxic substances to J2, either in liquid medium (filtrate) as in colonies grown in solid medium. The exposure of J2 by

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

48 hours in colony exsudate increased mortality compared to 24 hours incubation. The colony exsudates of ALF 2, ALF 4, SOR 3 and CAF 2 isolates, among seven tested, reduced ($P \leq 0,05$) the total J2 hatching after fifteen days of incubation compared to control. These colony exsudates caused also mortality when incubated by 24 and 48 hours. However these toxicities did not occurred when J2 was exposed to the filtrates of the same culture isolates. Except ALF 4 isolate, all others tested, reduced hatching at the second incubation day. Since then, the hatching curve progress among isolates varied greatly. Among four isolates that significantly reduced the total hatching, the CAF 2 and ALF 2 isolates had always less hatching than control in any measured time period. However the SOR 3 isolate had less hatching than control only after ten day of incubation. All the others isolates (QUI 4, GOI 5 and BRA 4) the hatching was always close to control.

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

1 INTRODUÇÃO

A excreção de substâncias por microorganismos no meio em que crescem é conhecida há muito tempo (Yarborough et al., 1993). A sua função pode ser ecológica, inibindo o crescimento ou desenvolvimento do competidor, como os antibióticos em bactérias (Keel et al., 1990), ou mesmo promovendo associações com outros microorganismos em plantas como os fungos micorrízicos (Hallman & Sikora, 1996). A indústria tem explorado estas substâncias comercialmente. Muitos fungos e bactérias produzem substâncias químicas já colocadas no mercado (Nardo & Capalbo, 1998). Essas substâncias, tanto produzidas “in vitro” como “in vivo”, têm sido estudadas também no sentido de descobrir antagonismo com patógenos de plantas. Substâncias produzidas “in vitro” por fungos e bactérias têm inibido a eclosão, afetando a mobilidade e causando mortalidade em fitonematóides (Costa et al., 2000).

Os actinomicetos produzem antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos de interesse industrial (Willians & Vickens, 1988). Na agricultura, a avermectina produzida pelo actinomiceto *Streptomyces avermitilis* (Stretton et al., 1987) tem efeito nematicida, já testado no controle de *Meloidogyne incognita*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Tylenchorhynchus dubius* e *Pratylenchus penetrans* (Garabedian & Van Gundy, 1983; Sasser et al., 1982; Blackburn et al., 1996).

A ocorrência de actinomicetos em solos pobres e de baixo pH, como aqueles do cerrado brasileiro (Pereira, 1995), abre perspectivas para pesquisa em rizosferas de novas espécies de plantas, bem como na procura de moléculas produzidas por eles com possibilidades de aplicação no controle de fitodoenças, principalmente aquelas causadas por nematóides. De forma a se conhecer novas moléculas produzidas por actinomicetos e tóxicas a fitonematóides, bem como o efeito nematicida dessas moléculas, objetivou-se neste trabalho: estudar o efeito

de exsudatos de colônias de actinomicetos em meio sólido, bem como de filtrados de culturas em meio líquido na eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de filtrados de culturas de actinomicetos e de exsudatos de colônias em meio sólido.


Na obtenção dos filtrados utilizaram-se 41 isolados de actinomicetos. Deles, 27 eram procedentes da rizosfera de culturas de interesse econômico e 14 de ervas daninhas e gramíneas, os quais estavam preservados em meio glicérol 10% e mantidos em deep freezer a - 20°C. Esses isolados foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de amido (SCN) e incubados a 25°C em câmara de crescimento (BOD) durante 7 dias. Após esse período, foi transferido um disco de 5 mm de diâmetro de cultura pura de actinomiceto para Erlenmeyers contendo o meio líquido de extrato de malte ISP2 (MYE) com a seguinte composição: extrato de malte (10g), amido solúvel (10g), dextrose (4g), extrato de levedura (4g) e pH ajustado antes da autoclavagem para 6,8. Após essa transferência, foi feita a incubação durante 14 dias a 25°C, em agitador orbital "shaker", a 140 rpm. Ao final desse período, as culturas foram centrifugadas a 15.000 g, por 10 minutos para remoção das estruturas do actinomiceto. O sobrenadante foi colocado em vidro de penicilina estéril e mantido no "freezer" até a utilização no ensaio.

Na obtenção dos exsudatos de colônias de actinomicetos foram empregados 37 isolados obtidos e armazenados como descrito acima. Esses isolados foram cultivados em meio de amido (SCN) e, com 7 dias de crescimento em placa, foram repicados para tubos de ensaio contendo o meio inclinado de aveia (OA) com a seguinte composição: aveia (30g), ágar (20g). A seguir, os tubos foram colocados em câmara de crescimento e mantidos a temperatura de 25°C até completar 7 dias. Após esse período, em câmara de fluxo laminar, foram adicionados 4 mL de água destilada esterilizada em cada

tubo, agitando-o, em seguida, num agitador de tubos durante 1 minuto. No final dessa operação, a solução obtida foi transferida para vidros do tipo penicilina devidamente esterilizados e armazenados em geladeira até utilização no ensaio. Foram usados 4 tubos de ensaio para obter a solução de cada isolado de actinomiceto.

2.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Os ovos foram obtidos de raízes galhadas de tomateiros cultivados em casa de vegetação pela técnica de Hussey & Barker (1973). Os resíduos de raízes e impurezas foram separados dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herbe (1972). Para isto, colocou-se a suspensão de ovos em tubos de centrífuga de 50 mL, juntamente com 3g de caulim, centrifugando-a por 5 minutos, a 680g. Eliminou-se o líquido sobrenadante e completou-se o volume dos tubos com solução de sacarose preparada com 464 gramas de açúcar cristal num copo e completado o volume para 1 litro. Os tubos foram bem agitados para colocar em suspensão todo o sedimentado. Centrifugou-se por 60 segundos, a 680 g e derramou-se cuidadosamente o sobrenadante numa peneira de 0,025 mm, sem agitar o sedimentado. Recolheram-se os ovos que ficaram retidos na peneira, em um béquer de 1000 mL, utilizando-se uma piseta com água. Para desinfestação em câmara de fluxo laminar, a suspensão de ovos foi passada em peneira de 0,021 mm previamente desinfestada. Os ovos retidos nesta peneira foram lavados três vezes com água destilada esterilizada. Em seguida, foram colocados numa solução de pentabiótico 300ppm por um minuto e lavados com água destilada esterilizada. Essa operação foi repetida por quatro vezes, quando então a suspensão de ovos foi colocada num erlenmeyer estéril e armazenada para uso nos ensaios.



Os juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* foram obtidos a partir da coleta em câmaras de eclosão, montadas com tela e papel poroso em um funil de porcelana, onde a suspensão de ovos foi vertida. Os J2 produzidos nas primeiras 24 horas foram descartados, sendo empregados nos ensaios apenas J2 com 48 e 72 horas após a eclosão. Na desinfestação, a suspensão de J2 foi levada a uma câmara de fluxo laminar e passada em peneira de 0,021 mm, na qual ficaram retidos. A peneira com os J2 foi imersa em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 minuto e, em seguida, em solução de pentabiótico 300 ppm por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada esterilizada. Dessa forma, os J2 estavam prontos para uso nos ensaios.

2.3 Efeito de filtrados de culturas de actinomicetos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Em células de placa tipo Elisa foram colocados 150 μ L do filtrado de actinomiceto obtido conforme descrito anteriormente e 50 μ L de uma suspensão de cerca de 25 J2 de *Meloidogyne javanica* previamente desinfestados conforme descrição anterior. As placas foram vedadas com parafilme e colocadas em câmara de crescimento a 25°C. Após 24 horas, avaliaram-se, com auxílio de microscópio biológico de objetiva invertida, as porcentagens de J2 imobilizados e mortos. Foram considerados mortos os nematóides que, após terem sido retirados do filtrado e transferidos para água, não recuperaram a mobilidade. Foram avaliados os filtrados de 41 isolados de actinomicetos utilizando-se 4 repetições para cada tratamento. Nas testemunhas, os J2 foram incubados em água destilada esterilizada, meio líquido de extrato de malte sem cultivo de actinomiceto e em solução de Temik a 100 ppm. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso em quatro repetições. As médias dos

tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (Scott & Knott, 1974), a 5% de significância, após transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

2.4 Efeito do filtrado de culturas de actinomicetos na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

Montou-se uma câmara especial de eclosão com tubos do tipo Eppendorf. Para isso, os fundos de dois tubos foram cortados e entre eles foi colocada uma tela metálica de 0,025 mm e depois colados (Figura 1). Todo o conjunto foi desinfestado após imersão em álcool 70% por 15 minutos. Dois mL de uma suspensão com 300 ovos de *M. javanica* previamente desinfestados foram vertidos nesta câmara. Com auxílio de uma bomba de vácuo, a água da suspensão foi drenada para o tubo geminado inferior e os ovos retidos na tela. A seguir, verteu-se no tubo 1 mL do filtrado de culturas de actinomicetos. O tubo foi então fechado com a tampa rosqueada e colocado em BOD a 25°C. Quinze dias após avaliou-se o número de J2 eclodidos com auxílio de microscópio de objetiva invertida. Foram testados 7 filtrados de isolados de actinomicetos que tiveram efeito na motilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* como descrito no item 2.3. Como testemunhas, os ovos foram incubados em água de torneira, em meio líquido de extrato de malte e em solução 100 ppm de Temik. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em 4 repetições. Usou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparar as médias, após transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

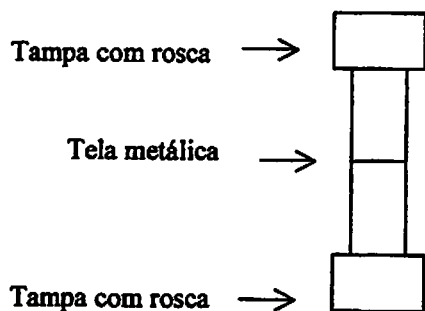


FIGURA 1 Câmara especial de eclosão feita com tubos Eppendorf acoplados e separados por uma tela metálica de 0,025 mm de diâmetro de poro.

2.5 Efeito de exsudatos de colônias de actinomicetos na eclosão, mobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

O ensaio sobre incubação de J2 para o estudo da sua mobilidade e mortalidade foi montado em placa Elisa esterelizada. Para isto, 150 μ L do exsudato de colônia de actinomiceto foram colocados em cada célula da placa Elisa, juntamente com 50 μ L da suspensão contendo 30 J2 de *M. javanica* previamente desinfestados. As placas foram vedadas com parafilme e colocadas em câmara de crescimento a 25°C. Após 24 e 48 horas, avaliaram-se, com auxílio de microscópio biológico de objetiva invertida, as porcentagens dos J2 imobilizados e mortos. Foram considerados mortos os J2 que, transferidos para a água, não recuperaram a mobilidade. Testaram-se exsudatos de colônias de 37 isolados de actinomicetos. Como testemunhas, os J2 foram incubados em água. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com 4 repetições. As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (Scott

& Knott, 1974) e diferenciadas a 5% de probabilidade, após transformação dos dados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

No ensaio sobre o efeito de exsudato de colônias de actinomicetos na eclosão de J2, empregaram-se os isolados que imobilizaram ou mataram J2 no ensaio anterior. Para isso, 2 mL do exsudato de colônias foram colocados em placas de plástico, de 4,5 cm de diâmetro. A seguir, foram pipetados 100 μ L de suspensão previamente desinfestada contendo 350 ovos de *Meloidogyne javanica*. Como testemunhas, os ovos foram incubados em água, em exsudato do isolado GOI 5 que não afetou J2 no ensaio anterior e em solução de 100 ppm de Temik. As placas foram fechadas e incubadas a 25°C em câmara de crescimento. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 7 exsudatos em 4 repetições. O experimento foi avaliado a cada 48 horas até completar 15 dias, contando-se o número de J2 eclodidos em microscópio de objetiva invertida. Ao final, calculou-se a porcentagem de J2 eclodidos. A comparação entre as médias foi feita como descrito no ensaio anterior.

2.6 Efeito de diluições de filtrados de cultura de actinomicetos na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Foram selecionados cinco filtrados de actinomicetos entre os que se mostraram mais eficientes na redução da motilidade e no aumento da mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*. Para isso, esses filtrados foram diluídos em água destilada esterilizada nas proporções de 1:0, 1:1 e 1:2 (v/v) (filtrado:água), colocados em tubos de Eppendorf e para eles transferiram-se, em seguida, 30 J2 de *Meloidogyne javanica* desinfestados conforme descrito no item 2.3. Os tubos foram então fechados e mantidos a 25°C em câmara de crescimento. Após 24 horas, avaliou-se o número de J2 imóveis e mortos.

Consideraram-se mortos os J2 que após terem sido retirados do filtrado e transferidos para água, não recuperaram a mobilidade. Como testemunhas os J2 foram incubados em água de torneira, meio líquido de extrato de malte e em solução 100 ppm de Temik. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizados com 4 repetições. A comparação entre as médias foi feita como descrito anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de filtrados de culturas de actinomicetos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e estudos com diluições

A motilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 15 dos 41 isolados de actinomicetos testados, comparada com às testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou no meio líquido MYE. Dez deles reduziram a motilidade ao nível ($P \leq 0,05$) da solução de Temik. Essas reduções variaram de 12% a 100% (Tabela 1). Contudo, a mortalidade de J2 foi significativa em 11 dos 41 isolados testados, comparada às testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou no meio líquido. Dos isolados que causaram mortalidade, apenas o ALF 4 causou 75%, os demais 100%, semelhantes ($P \leq 0,05$) ao nível de mortalidade ocorrido na incubação de J2 em Temik (Tabela 1). A mortalidade ocorreu sempre quando houve redução na motilidade, entretanto 5 isolados causaram imobilidade, mas não mortalidade de J2 (Tabela 1).

A ocorrência, nem sempre concomitante, de imobilidade e mortalidade indica, talvez, a presença de substâncias diversas no filtrado com modos diferentes de atuação no J2. As substâncias envolvidas na mortalidade de J2 parecem ser altamente tóxicas, já que causaram sempre 100% de mortalidade e podem ocorrer tanto em isolados obtidos na rizosfera de culturas de interesse econômico, como também nas de ervas daninhas ou gramíneas.

Al-Doori et al. (1991) testaram o efeito de filtrado de *Streptomyces* produzido em meio líquido MYE sobre o verme *Toxocara canis* e constataram 100% de mortalidade do verme após 10 dias da incubação no filtrado. Kasuyoshi et al. (2002) encontraram supressão da motilidade de J2 de *M.*

incognita pelo filtrado de culturas de isolados de *Streptomyces* após extração com acetona.

TABELA 1 Efeito de filtrado de cultura de actinomicetos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.em 24 horas de exposição.

Testemunhas e isolados testados	Imóveis (%)	Mortos (%)
TESTEMUNHA (MYE)	0 f	0 c
TESTEMUNHA (ÁGUA)	0 f	0 c
TESTEMUNHA (TEMIK)	100 a	100 a
QUI 8	100 a	100 a
CAF 8	100 a	100 a
CAF 5	100 a	0 c
PIC 1	100 a	100 a
QUI 4	100 a	100 a
GOI 5	100 a	100 a
QUI 6	100 a	100 a
MAM 1	100 a	100 a
JIL 5	100 a	100 a
CES 2	100 a	100 a
ALF 4	95 b	75 b
SOR 2	88 c	0 c
MAM 3	45 d	0c
BRA 2	15 e	0 c
ALF 3	0 f	0 c

Médias seguidas por letras distintas em coluna diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

MYE= meio de cultura

“....Continua....”

“TABELA 1, Cont.”

Testemunhas e isolados testados	Imóveis (%)	Mortos(%)
BRA 3	12 e	0 c
JIL 4	0 f	0 c
CES 1	0 f	0 c
ALF 2	0 f	0 c
ALH 3	0 f	0 c
MEL 2	0 f	0 c
MIL 1	0 f	0 c
QUI 2	0 f	0 c
COU 8	0 f	0 c
QUI 1	0 f	0 c
BRA 4	0 f	0 c
BRA 5	0 f	0 c
COU 5	0 f	0 c
ALH 1	0 f	0 c
CAR 1	0 f	0 c
JIL 1	0 f	0 c
GRA 1	0 f	0 c
MEL 3	0 f	0 c
COU 3	0 f	0 c
COU 1	0 f	0 c
CAF 9	0 f	0 c
TOM 1	0 f	0 c
ALF 1	0 f	0 c
CEL 1	0 f	0 c
MEL 4	0 f	0 c
JOÁ 1	0 f	0 c

Médias seguidas por letras distintas em coluna diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Todos os 7 isolados de actinomicetos testados reduziram significativamente a eclosão total de J2 de *M. javanica*, comparada às testemunhas em que o J2 foi incubado em água ou em meio líquido MYE, porém, semelhante ($P \leq 0,05$) àquela em solução de Temik (Tabela 2). Esses mesmos isolados causaram 75% a 100% de mortalidade de J2 em ensaio anterior (Tabela 1).

TABELA 2 Efeito de filtrado de cultura de actinomicetos na percentagem de eclosão total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* após 15 dias de incubação.

Testemunha e isolados testados	Eclosão (%)
Testemunha (água)	90 a
Testemunha (MYE)	81 b
Temik (100 ppm)	1 c
JIL 5	5 c
QUI 8	2 c
MAM1	3 c
CAF 8	1 c
ALF 4	1 c
QUI 6	2 c
PIC 1	3 c

Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

MYE – meio líquido extrato de malte

Uma ou várias substâncias excretadas no filtrado afetaram tanto a eclosão como a mortalidade de J2. Redução na reprodução de *Caenorhabditis elegans* de 55% e 96% em 3 e 7 dias, respectivamente, de incubação em filtrado de *Streptomyces* sp. foi encontrada por Dicklow et al. (1993). Esse efeito foi correlacionado pelos autores com a má formação das paredes das células germinais do ovário da fêmea, além de envolver várias substâncias separadas por diálise.

Diluições em 1:1 e 1:2 de filtrados de 4 culturas de actinomicetos reduziram em aproximadamente 75% a 85% a mortalidade de J2, respectivamente. Contudo, essas mesmas diluições não alteraram o nível de 100% de mortalidade causado pelo isolado PIC 1 (Figura 2).

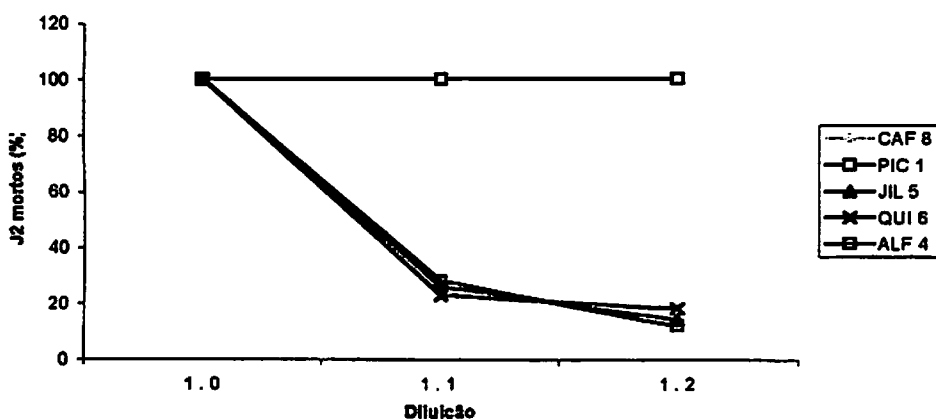


FIGURA 2 Efeito de diluições de filtrados de culturas de actinomicetos (CAF 8, PIC 1, JIL 5, QUI 6 e ALF 4) na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, após 24 horas de exposição.

O isolado PIC 1, possivelmente, produza, nestas condições, substâncias tóxicas a J2 em alta concentração ou mesmo de alto poder tóxico, comparado aos demais testados (Figura 2). Burg et al. (1979) isolaram, a partir da fermentação do micélio de *Streptomyces avermitilis*, uma nova classe de lactonas macrocíclicas conhecidas como avermectinas. Essas avermectinas e seus derivados semi-sintéticos foram eficazes contra algumas espécies de nematóides em doses extremamente baixas, tendo efeito nematicida até dez vezes superior ao "oxamil" e aldicarbe, no entanto, apresentando baixa toxicidade em mamíferos (Garabedian & Van Gundy, 1983).

3.2 Efeito de exsudatos de colônias de actinomicetos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

A mobilidade de J2 de *M. javanica* foi reduzida ($P \leq 0,05$) por 4 e 6 exsudatos de colônias de actinomicetos, dos 37 testados, em incubação por 24 e 48 horas, respectivamente, comparada com aquela em água. Essa redução variou de 70% a 100%. Dois isolados reduziram a mobilidade em 100%, semelhante ($P \leq 0,05$) àquela ocorrida na solução de Temik (Tabela 3). Os mesmos isolados que reduziram a mobilidade causaram também mortalidade a qual variou de 19% a 100% quando os J2 foram expostos por 24 e 48 horas. Os isolados ALF 4 e QUI 4 produziram substâncias tóxicas a J2 em filtrado de cultura (Tabela 1) e em exsudato de colônia (Tabela 3). A exposição dos J2 por 48 horas aumentou a mortalidade comparada àquela em 24 horas.

A obtenção de substâncias antagônicas a fitonematóides de colônias de actinomicetos pode facilitar a seleção de isolados, bem como a purificação dessas substâncias, pois elas não estariam misturadas a ingredientes do meio de cultura, o que ocorre quando se cultiva em meio líquido.

TABELA 3 Efeito de exsudatos de colônias de actinomicetos na percentagem de motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em 24 e 48 horas de exposição.

Tratamento	Tempo de exposição dos J2			
	24 horas		48 horas	
	Imóveis (%)	Mortos (%)	Imóveis (%)	Mortos (%)
TEST (ÁGUA)	0 e	0 e	0 e	0 d
TEST (TEMIK)	100 a	100 a	100 a	100 a
ALF 2	100 a	100 a	100 a	100 a
SOR 3	91 b	19 d	100 a	64 c
BRA 4	79 c	32 c	77 d	66 c
ALF 4	70 d	71 b	82 d	80 b
QUI 4	0 e	0 e	83 b	84 b
CAF 2	0 e	0 e	79 c	82 b
COU 2	0 e	0 e	0 e	0 d
QUI 6	0 e	0 e	0 e	0 d
QUI 2	0 e	0 e	0 e	0 d
QUI 5	0 e	0 e	0 e	0 d
ALF 1	0 e	0 e	0 e	0 d
BRA 1	0 e	0 e	0 e	0 d
QUI 3	0 e	0 e	0 e	0 d
MAM 2	0 e	0 e	0 e	0 d
COU 3	0 e	0 e	0 e	0 d
CAF 7	0 e	0 e	0 e	0 d
QUI 7	0 e	0 e	0 e	0 d
GRA 2	0 e	0 e	0 e	0 d
CES 1	0 e	0 e	0 e	0 d

Médias seguidas por letras distintas em colunas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

“.....Continua.....”

“TABELA 3, Cont.”

Tratamento	Tempo de exposição dos J2			
	24 horas		48 horas	
	Imóveis (%)	Mortos (%)	Imóveis (%)	Mortos (%)
CAF 1	0 e	0 e	0 e	0 d
CAF 12	0 e	0 e	0 e	0 d
MEL 3	0 e	0 e	0 e	0 d
PIC 1	0 e	0 e	0 e	0 d
CAF 9	0 e	0 e	0 e	0 d
CAF 4	0 e	0 e	0 e	0 d
BRA 5	0 e	0 e	0 e	0 d
COU 10	0 e	0 e	0 e	0 d
CAF 6	0 e	0 e	0 e	0 d
CEL 1	0 e	0 e	0 e	0 d
CES 2	0 e	0 e	0 e	0 d
SOR 1	0 e	0 e	0 e	0 d
JIL 4	0 e	0 e	0 e	0 d
BRA 3	0 e	0 e	0 e	0 d
PIC 4	0 e	0 e	0 e	0 d
MAM 3	0 e	0 e	0 e	0 d
GOI 5	0 e	0 e	0 e	0 d
CES 9	0 e	0 e	0 e	0 d

Médias seguidas por letras distintas em colunas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A exsudação de colônias tem sido estudada em bactérias. Balota et al. (1995) extraíram exsudatos de colônias de bactérias diazotróficas após centrifugação da cultura em meio líquido e ressuspensão do sedimento em água. Esse exsudato bacteriano diminuiu o crescimento micelial do fungo micorrízico *Gigapora gigantea*. Park et al. (2002) observaram 50% a 90% de redução da

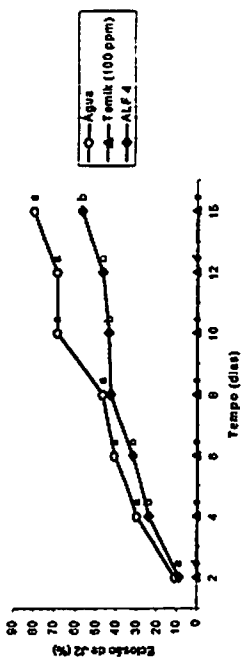
mobilidade de *Caenorhabditis elegans* em 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, quando colocados diretamente na colônia do actinomiceto *Streptovercillium albireticuli* cultivado em placas de Petri por 7 dias no meio FMEA.

Entre os 4 isolados que reduziram significativamente a eclosão total (Tabela 4), o CAF 2 e ALF 2 tiveram sempre menor eclosão do que a testemunha em qualquer período de avaliação (Figura 3 B,C). Entretanto, o SOR 3 teve eclosão abaixo da testemunha apenas a partir do 10º dia de incubação (Figura 3D). Nos demais isolados (QUI4, GOI 5 e BRA 4), a eclosão de J2 foi sempre próxima da testemunha (Figura 3 B,C,D).

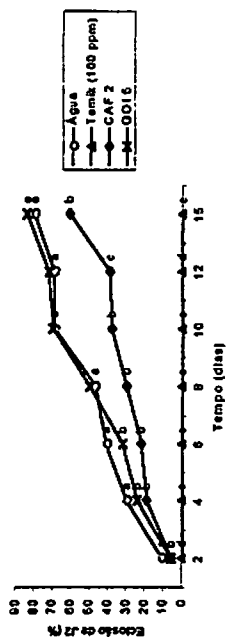
TABELA 4 – Efeito dos exsudatos de colônias de actinomicetos que afetaram a mobilidade e causaram mortalidade de juvenis do segundo estágio em ensaio anterior, na eclosão total de J2 de *Meloidogyne javanica* após 15 dias de incubação.

Testemunha e isolados testados	Eclosão (%)
Testemunha (água)	80 a
Temik (100 ppm)	0 c
CAF 2	61b
GOI 5	84 a
QUI 4	72 a
SOR 3	62 b
ALF 2	54 b
ALF 4	57 b
BRA 4	83 a

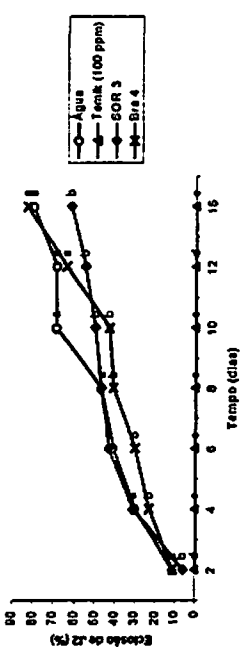
Médias seguidas por letras distintas diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.



A)



B)



C)

D)

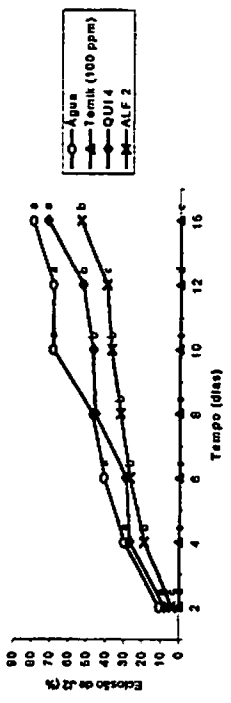


FIGURA 3. Progresso da eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* nos exsudatos de colônias dos isolados: A) ALF 4 e controle, B) CAF 2 e GOI 5, C) QUI 4 e ALF 2, D) SOR 3 e BRA 4 que causaram efeito na motilidade e mortalidade de J2 em ensaio anterior durante 15 dias de incubação. O GOI 5 foi usado como comparativo entre aqueles que não afetaram os J2. Também a incubação em água e Temik 100 ppm serviu-se de testemunhas. Letras minúsculas diferentes em cada ponto da curva indicam diferença estatística a 5% pelo teste de Scott & Knott (Scott e Knott, 1974).

No isolado SOR 3, talvez o efeito da toxina tenha ocorrido apenas nos eventos iniciais do desenvolvimento embrionário. Dessa forma, os ovos com juvenis formados ou mesmo no estágio avançado do desenvolvimento embrionário prosseguiram até a eclosão sem retardamento, comparado à testemunha. Já nos isolados CAF 2, ALF 2 e ALF 4, o efeito foi semelhante em qualquer fase do desenvolvimento embrionário.

A constatação de efeito tóxico em J2 dos isolados ALF2 e BRA 4 a partir de exsudatos de suas colônias, porém ausência nos filtrados, talvez seja decorrente da produção de substâncias tóxicas, apenas após a esporulação em meio sólido. Também, o terpenoide geosmin produzido por *Streptomyces* e de comprovada toxicidade a nematóides (Pollak & Berger, 1996) pode, talvez, estar presente na solução do exsudato da colônia. Entretanto, no filtrado pode ter sido volatilizado.

4 CONCLUSÕES

1 Filtrados de actinomicetos produzem metabólitos tóxicos, com efeitos significativos na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, comparáveis ao nematicida Temik.

2 Actinomicetos exsudam, em meio sólido, metabólitos com efeitos tóxicos significativos ao J2 de *Meloidogyne javanica* afetando a motilidade, mortalidade e eclosão comparáveis ao nematicida Temik.

3 O filtrado de cultura do isolado PIC 1, mesmo em diluições, reduziu drasticamente a mobilidade e causou alta mortalidade em J2 de *M. javanica*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DOORI, M.; AL-TAE, A. A.; JALIL, S.; HASSAN, S. A. Larvicidal activity of actinomycetes isolates against *Toxocara canis*. *Folia Parasitologica, Ceske Budejovice*, v. 38, n. 4, p. 379-832, 1991.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, v. 30, n. 11, p. 1335-1345, nov. 1995.
- BLACKBURN, K.; ALM, S. R.; YEH, T. S. Avermectin B1, izafox, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. *Journal of Nematology, Lawrence*, v. 28, n. 4, p. 687-694, Dec. 1996. Supplement.
- BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUN, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, D. Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. *Antimicrobial Agents, Chemotherapy, Washington*, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.
- COOLEN, W. A.; D'HERBE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.
- COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plants e de esterco animais. *Nematologia Brasileira, Piracicaba*, v. 24, n. 2, p. 219-226, 2000.
- DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B. M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. *Journal of Chemical Ecology, New York*, v. 19, n. 2, p. 159-173, Feb. 1993.
- GARABEDIAN, S.; VAN GUNDY, S. D. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. *Journal of Nematology, Leiden*, v. 15, n. 4, p. 503-510, Oct. 1983.

HALLMAN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v. 102, n. 2, p. 155-162, Jan. 1996.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.

KAZUYOSHI, C.; FURUKAWA, M.; FUKUDA, S.; SHOJI, M.; YANAGISAWA, T.; HIDEO, I.; TERUO, S.; AKIRA, N. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. **Biocontrol Science**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 25-29, 2002.

KEEL, C.; WIRTHNER, P. H.; OBERHANSLI, T. H.; VOISARD, C.; BURGER, U.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. **Symbiosis**, Rehovot, v. 9, n. 1/3, p. 327-342, 1990.

NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. O processo de avaliação de risco do uso de agente microbianos de controle:: testes ecotoxicológicos sobre organismos não visados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 1998. No prelo

PARK, J. O; EL-TARABILY, K. A; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 361-365, Nov. 2002.

PEREIRA, J. C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrado**. 1995. 172 p. Tese (Doutorado em Solos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

POLLAK, F. C.; BERGER, R. G. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109. 60. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1295-1299, Apr. 1996.

SASSER, J. N.; KIRKPATRICK, T. L.; DYBAS, R. A. Efficacy of avermectins for root-knot control in tobacco. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, n. 8, p. 691-693, Aug. 1982.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

STRETTON, A. O. W.; CAMPBELL, W. C.; BABU, J. R. Biological activity and mode of action of avermectins. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. *Vistas on nematology: a commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists*. Hyattsville: society of Nematology, 1987. p. 136-146.

WILLIAMS, S. T.; VICKENS, J. C. Detection of actinomycetes in the natural environment-problems and perspectives. In: OKANI, Y.; BEPPER, T.; OGAWARA, H. (Ed.). *Biology of the Actinomycetes* Tokyo, 1988. p. 265-270.

YARBROUGH, G. G.; TAYLOR, D. P.; ROWLANDS, R. T.; CRAWFORD, M. S.; LASURE, L. L. Screening microbial metabolites for new drugs: theoretical and practical issues. *The Journal of Antibiotics*, Kyoto, v. 46, n. 4, p. 535-544, Apr. 1993.

CAPÍTULO 5

PARASITISMO DE ACTINOMICETOS A *Meloidogyne javanica*

RESUMO

COIMBRA, J. L. Parasitismo de actinomicetos a *Meloidogyne javanica* In: ____. **Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas.** 2003. Cap. 5, p. 87-97. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A capacidade parasitária de actinomiceto em juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* foi estudada em 37 isolados cultivados em meio de amido (SCN) e a suspensão de esporos colocada em areia seguida da adição de J2. Noutro ensaio, dez isolados também cultivados em SCN foram testados, porém, adicionando-se os J2 nas colônias de cada isolado em placa de Petri. No terceiro ensaio, os isolados de actinomicetos foram cultivados em diferentes meios e a seguir procedeu-se ao teste de parasitismo. Dos isolados cultivados em SCN e testados em suspensão em água ou adicionados em areia na presença de J2 de *M. javanica*, não se observou nenhum parasitismo. Entretanto, dos 10 isolados cultivados em diferentes meios, observou-se parasitismo em J2 num deles (JOÁ 2) cultivado no meio com quitina. Nesses J2, hifas foram observadas, na sua extremidade anterior, ocorrendo em 3% dos espécimens. Quando esse isolado, JOÁ 2, foi cultivado noutro meio sem quitina, não ocorreu o parasitismo. Foi a primeira vez que se observou o parasitismo de um fitonematóide por actinomiceto.

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

ABSTRACT

COIMBRA, J.L. Parasitism of *Meloidogyne javanica* to actinomycetes In: ____. *Actinomicetos como agentes de controle biológico dos nematóides de galhas*. 2003. Cap. 5, p. 87-97. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The parasitism capacity of isolates of actinomycetes on second stage juveniles (J2) of *M. javanica* was studied in thirty seven isolates cultivated in starch medium (SCN) and the spore suspension obtained, was poured into glass tubes with sand followed by addition of J2 suspension. In another assay, ten isolates also cultivated in SCN medium were tested, by adding J2 suspension onto colonies of each isolate in Petri dishes. In the third assay isolates of actinomycetes were cultivated in different media followed by parasitism test in J2. Parasitism of *M. javanica* J2 was not observed when isolated were cultivated in SCN medium regardless of the test in water or sand. However, when the isolates were previously, cultivated in different media, one isolate (JOÁ 2) among ten tested showed parasitism in J2 of *M. javanica* only when cultivated in chitin medium. Hypha were observed in the external part of the mouth region of the J2 in three percent of the specimens. This is the first time a parasitism of plant parasitic nematode by actinomycetes is observed.

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

1 INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são organismos conhecidos e bastante pesquisados pela sua ampla produção de metabólitos (Melo & Azevedo, 1988), os quais podem ter efeito nematicida, como as avermectinas produzidos por *Streptomyces avermitilis* de amplo espectro anti-helmíntico e inseticida (Melo, 1998; Stretton et al., 1987). A antibiose pode ser outro provável mecanismo para explicar o controle de nematóides fitoparasitos por actinomicetos já estudado por alguns pesquisadores (Park et al., 2002; Kazuyoshi et al., 2002; Walker et al., 1966). Por outro lado, existem, na literatura, relatos sobre associações entre actinomiceto e nematóides, como o gênero *Streptomyces*, já isolado de cistos de *Heterodera glycines* e *Heterodera trifolii*, massa de ovos de *Tylenchulus semipenetrans* e do corpo dos nematóides *Ditylenchus trififormis* e *Tylenchulus semipenetrans*, (Dürschner, 1984; Walter & Kaplan, 1990; Nour et al., 2003; Hay & Skipp, 1993).

Os conhecimentos sobre essas associações são escassos, podendo ocorrer pelo simples crescimento do actinomiceto sobre resíduos de matéria orgânica no corpo do nematóide ou por meio de uma interação mais complexa, resultando no parasitismo, envolvendo a degradação da cutícula do corpo do nematóide seguida da utilização das substâncias resultantes como fontes únicas de carbono para o crescimento do actinomiceto. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho investigar a capacidade de isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera em parasitar juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em água, meio de cultura e areia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No ensaio com suspensões de esporos em água, 37 isolados de actinomicetos foram cultivados em meio de amido (SCN). Sete dias após, foram repicados para tubos de ensaio inclinado contendo meio de aveia (30g de aveia e 20g de ágar), seguido da incubação em BOD a 25°C por 7 dias. Em câmara de fluxo laminar foi preparada suspensão de esporos, adicionando-se 4 mL de água destilada esterilizada em cada tubo e agitando-os em agitador durante 1 minuto. Em células de placa tipo Elisa foram colocados 150µL da suspensão de esporos de actinomicetos e 50µL de suspensão de cerca de 25 J2 de *Meloidogyne javanica* previamente desinfestados. As placas foram vedadas com parafilme e colocadas dentro de uma câmara de crescimento onde foram mantidas a 25°C. Quatro dias após, com auxílio de microscópio biológico de objetiva invertida, contou-se o número de J2 parasitados. O experimento foi montado com 4 repetições para cada tratamento, sendo a testemunha constituída de água. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições em testemunha em que os J2 foram incubados em água.

No ensaio em que os J2 foram colocados nas colônias em meio de cultura sólido, dez isolados de actinomicetos mantidos em glicerol 10% e armazenados em freezer a -20°C foram repicados para placas de Petri com meio SCN e incubados a 25°C em BOD por 7 dias. A seguir esses isolados foram repicados, novamente, para quatro meios diferentes: ágar (NA), “ tryptic soy agar” (TSA), amido solúvel (SCN) e quitina coloidal (CCMS) em tubos de ensaio. Em seguida, esses tubos repicados foram incubados em BOD a 25°C por 7 dias. No final desse período, adicionaram-se, em cada tubo de ensaio, 50 µL da suspensão contendo trinta J2 de *Meloidogyne javanica* devidamente desinfestados e novamente incubados em BOD a 25°C por 4 dias. Após esse período, os tubos foram abertos e no seu interior foram aplicados jatos de água

produzidos com auxílio de uma piseta, de forma a recuperar os J2 adicionados. A suspensão de J2 obtida foi colocada numa caixa de contagem e observada ao microscópio de objetiva invertida no aumento de 1000X a procura de J2 parasitado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e a testemunha foi constituída de meio sem actinomiceto.

No ensaio em que se adicionou a suspensão de esporos em areia, dez isolados de actinomicetos mantidos em glicerol 10% e armazenados em “freezer” a -80°C foram transferidos para placas de Petri contendo meio SCN e incubados a 25°C em BOD durante 7 dias. A seguir, preparou-se a suspensão de esporos adicionando-se às placas água destilada e raspando-se com auxílio de uma alça de Drigalski. Num vidro de penicilina estéril contendo areia esterilizada e umedecida com 3 mL de água destilada esterilizada, foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos, juntamente com 100 μL de uma suspensão contendo 200 J2 de *Meloidogyne javanica* desinfestados. Após essa operação, o vidro foi fechado e incubado em câmara de crescimento a 25°C por 4 dias. No final desse período, usando-se uma piseta com solução de sacarose (0,5 g/mL), a areia foi transferida do vidro de penicilina para tubos de centrifuga, seguida de agitação para colocar em suspensão toda a areia. Centrifugou-se por 60 segundos, a 680 g e o sobrenadante foi vertido em peneira de 0,025 mm, sem agitar o sedimento. Recolheram-se os J2 que ficaram retidos na peneira, transferindo-os, em seguida, para caixa de contagem, visando à observação em microscópio de objetiva invertida no aumento de 1000X, procurando-se por J2 parasitado. Consideraram-se parasitados aqueles que tinham hifas aderidas em pontos do seu corpo. Usou-se o delineamento experimental inteiramente casualizados com 4 repetições e uma testemunha em que os J2 foram incubados em água.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos isolados cultivados em SCN e testados em suspensão em água ou adicionados em areia na presença de J2 de *M. javanica* não se observou nenhum parasitismo. Entretanto, dos 10 isolados cultivados em diferentes meios, observou-se parasitismo de J2 num deles (JOÁ 2) cultivado no meio com quitina CCMS (Tabela 1). Nesses J2, hifas foram observadas na sua extremidade anterior (Figura 1 A,B), ocorrendo em 3% dos espécimens. Quando esse isolado, JOÁ 2, foi cultivado noutro meio sem quitina, não ocorreu o parasitismo (Tabela 1). Foi a primeira vez que se observou o parasitismo de um fitonematóide por actinomiceto.

A adaptação do actinomiceto, isolado JOÁ 2, na produção de quitinase, quando cultivado no meio CCMS, pode, talvez, explicar sua capacidade parasitária em J2 de *M. javanica*, já que a enzima pode auxiliar na degradação da cutícula do nematóide. Miller & Sands (1977), testando os efeitos “in vitro” das enzimas proteases, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que, após 24 horas, houve modificações estruturais na cutícula do nematóide, devido a uma provável degradação enzimática. Segundo Park et al. (2002), enzimas conhecidamente produzidas pelos actinomicetos, como proteases, quitinases e lipases, podem auxiliar na destruição da cutícula dos nematóides e, conseqüentemente, possibilitar seu parasitismo nesses organismos. Esses mesmos autores observaram parasitismo em 55% dos nematóides *Caenorhabditis elegans* expostos por 6 horas em cultura do actinomiceto *Streptomyces albireticulli* em meio FMEA, aumentando esse parasitismo para 88% com 12 horas de exposição. Nos demais meios testados, não ocorreu parasitismo.

A capacidade parasitária de actinomiceto em J2 de *M. javanica* é restrita a poucos isolados, mesmo quando cultivado em meio com quitina. Essa indução

na produção de quitina e possível relação com o parasitismo, se verdadeira, pode explicar, talvez, o efeito da adição no solo de conchas de ostras, restos do corpo de mariscos, moluscos, insetos, etc., quando triturados, no controle dos nematóides *Meloidogyne arenaria* e *Heterodera glycines*, como obtidos por Mian et al. (1982) e Rodriguez-Kabana et al. (1984).

TABELA 1 - Parasitismo de isolados de actinomicetos em juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em cultura de meio sólido de ágar nutriente (NA), "tryptic soy agar" (TSA), amido (SCN) e quitina (CCMS).

Tratamento	Meios de cultura			
	NA	TSA	SCN	CCMS
JOA 2	(-)	(-)	(-)	(+)
TEST	(-)	(-)	(-)	(-)
MEL 2	(-)	(-)	(-)	(-)
ALH 3	(-)	(-)	(-)	(-)
ALH 1	(-)	(-)	(-)	(-)
ALF 2	(-)	(-)	(-)	(-)
JIL 5	(-)	(-)	(-)	(-)
QUI 9	(-)	(-)	(-)	(-)
COU 10	(-)	(-)	(-)	(-)
MEL 4	(-)	(-)	(-)	(-)
ALF 3	(-)	(-)	(-)	(-)

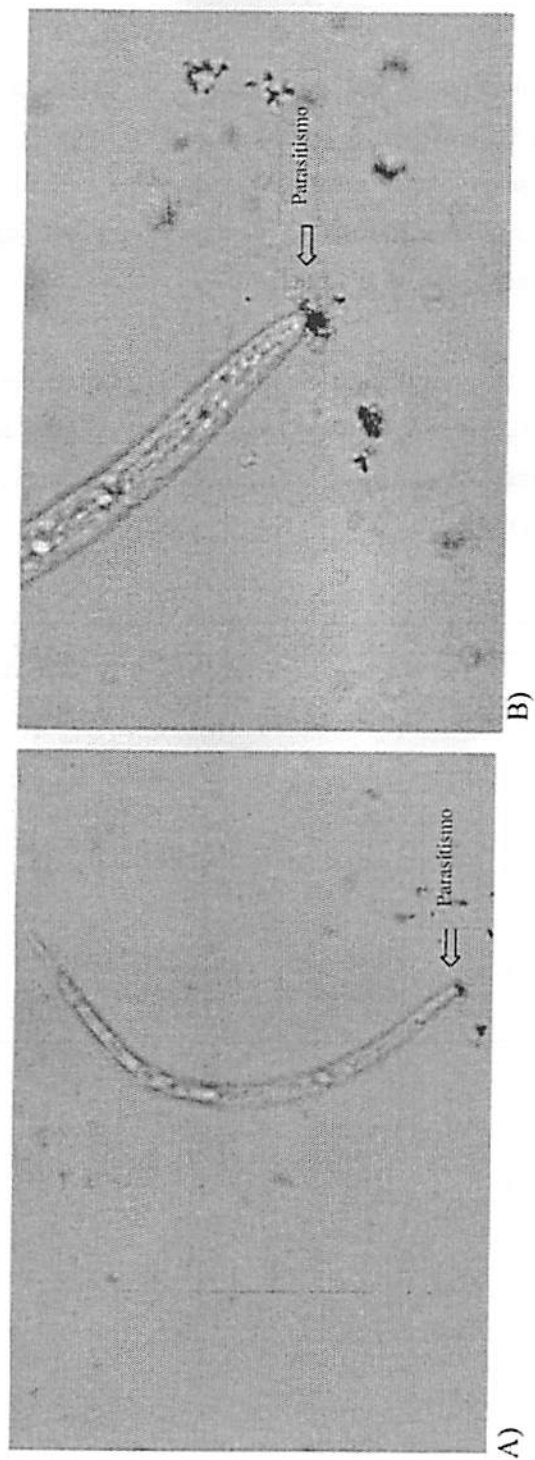


FIGURA 1 Juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* parasitado por actinomiceto.

4 CONCLUSÕES

1 Nenhum isolado de actinomiceto conseguiu parasitar juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* quando testado em água ou areia.

2 Apenas um isolado de actinomiceto demonstrou capacidade de parasitar, em placa, juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DÜRSCHNER, U. U. Observation on a new nematophagous actinomycetes. Proc. Ist. Int. Congr. Nematology Guelph, Canada, August, 1984. 23 p.

HAY, F. S.; SKIPP, R. A. Fungi and actinomycetes associated with cyst of *Heterodera trifolii* Goffart (nematoda: Tylenchida) in pasture soils in new zealand. *Nematologica*, Leiden, v. 39, n. 3, p. 376-384, July 1993.

KAZUYOSHI, C.; FURUKAWA, M.; FUKUDA, S.; SHOJI, M.; YANAGISAWA, T.; HIDEO, I.; TERUO, S.; AKIRA, N. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science*, Oxford, v. 7, n. 1, p. 25-29, 2002.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MIAN, I. H.; GODOY, G.; SHELBY, R. A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica*, Auburn, v. 12, n. 3, p. 221, 1982.

MILLER, P. M.; SANDS, D. C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, Lawrence, v. 9, n. 3, p. 192-197, July 1977.

NOUR, S. M.; LAWRENCE, J. R.; ZHU, H.; SWERHONE, G. D. W.; WELSH, M.; WELACKY, T. W.; TOPP, E. Bacteria associated with cyst of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 1, p. 607-615, Jan. 2003.

PARK, J. O.; EL-TARABILY, K. A.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-born fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 35, n. 5, p. 361-365, Nov. 2002.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G.; GINTIS, B. O. Effects of chitin amendments to soil on *Heterodera glycines*, microbial population and colonization of cysts by fungi. *Nematropica*, Auburn, v. 14, n. 1, p. 10-25, 1984.

STRETTON, A. O. W.; CAMPBELL, W. C.; BABU, J. R. Biological activity and mode of action of avermectins. In: **VEECH, J. A.; DICKSON, D. W.** **Vistas on nematology: a commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists.** Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 136-146.

WALKER, J. T.; SPECHT, C. H.; BEKKER, J. F. Nematocidal activity to *Pratylenchus penetrans* by culture fluids from actinomycetes and bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v. 12, n. 2, p. 347-351, 1966.

WALTER, D. E.; KAPLAN, D. T. Antagonism of plant-parasitic nematodes in florida citrus. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 22, n. 4, p. 567-573, Oct. 1990.

ANEXOS

ANEXO A

TABELAS	Página
1A - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de galhas/g de raiz do tomateiro	99
2A - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de massa de ovos/g de raiz do tomateiro	99
3A - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de ovos/g de raiz do tomateiro.....	99
4A - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas na matéria seca do tomateiro.	100

TABELA 1A Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de galhas/g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	42	846,080840	20,144782	18,936**
Resíduo	129	137,237334	1,063855	
Total	171	983,318174		

C.V. = 7,27

Média geral = 14,1970521

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 2A Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de massa de ovos/g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	42	937,656887	22,325164	13,568**
Resíduo	129	212,256313	1,645398	
Total	171	1149,91320		

C.V. = 10,2

Média geral = 12,574496

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 3A Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas no número de ovos/g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	42	237316,996	5650,40468	28,529**
Resíduo	129	25549,588		
Total	171	262866,584		

C.V. = 12,19

Média geral = 115,4724979

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 4A Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de diversas culturas na matéria seca do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	43	0,647847	0,015066	23,954**
Resíduo	132	0,083025	0,000629	
Total	175	0,730872		

C.V. = 12,51

Média geral = 0,2003977

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

ANEXO B

TABELAS	Página
1 B - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de galhas/g de raiz do tomateiro	102
2 B - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de massas de ovos/g de raiz do tomateiro....	102
3 B - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de ovos/g de raiz do tomateiro	102
4 B - Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas na matéria seca do tomateiro.....	103

TABELA 1B Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de galhas/g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	22	931,323881	42,332904	22,999**
Resíduo	69	127,006671	1,840676	
Total	91	1058,330551		

C.V. = 9,33

Média geral = 14,5432897

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 2B Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de massas de ovos/ g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	22	779,069838	35,412265	15,647**
Resíduo	69	156,158766	2,263171	
Total	91	935,228604		

C.V. = 12,92

Média geral = 11,6417406

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 3B Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas no número de ovos/ g de raiz do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	22	98093,129105	4458,778596	25,131**
Resíduo	69	12242,274838	177,424273	
Total	91			

C.V. = 12,77 Média geral = 104,3168562

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

TABELA 4B Resumo da análise de variância do efeito dos isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas daninhas e gramíneas na matéria seca do tomateiro.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	23	0,147172	0,006399	38,805**
Resíduo	72	0,012867	0,000179	
Total	95	0,160040		

C.V. = 1,58

Média geral = 0,8443437

Dados transformados em $\sqrt{x + 0.5}$

ANEXO C

TABELAS	Página
1C -Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de +actinomicetos	106
2C- Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de actinomicetos	106
3C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de actinomicetos	106
4C- Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:0.	107
5C- Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:1	107
6C- Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:2.	107
7C- Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 24 horas.	108
8C- Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 24 horas.	108
9C- Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 48 horas.....	108

10 C- Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 48 horas.....	109
11C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 2 dias.	109
12C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 4 dias.	109
13C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 6 dias.....	110
14C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 8 dias	110
15C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 10 dias.	110
16C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 12 dias.....	111
17C- Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> em exsudatos de actinomicetos após 15 dias.....	111

TABELA 1C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	43	756559,7816	17594,41352	608,623**
Resíduo	132	3815,928	28,908545	
Total	175	760375,7096		

C.V. = 10,04

Média geral = 53,53

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 2C Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	43	750641,743	17456,78473	51866,687**
Resíduo	132	44,427275	0,336570	
Total	175	750686,170		

C.V. = 1,24

Média geral = 46,8072159

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 3C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	9	6,1624	0,6847	31,59**
Resíduo	15	0,3251	0,0217	
Total	24	6,4875		

C.V. = 36,19 Média geral = 0,4067

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 4C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:0.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	7	113670,746	16238,67804	257,78 **
Resíduo	24	1511,86435	62,994348	
Total	31	115182,610		

C.V. = 8,56

Média geral = 92,666875

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 5C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:1.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	7	123004,775	17572,11072	525,608**
Resíduo	24	802,36755	33,431981	
Total	31	123807,142		

C.V. = 7,2

Média geral = 80,330625

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 6C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em filtrados de actinomicetos na diluição de 1:2.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	7	135344,625	19334,94644	224,499**
Resíduo	24	2067,00117	86,125049	
Total	31	137411,626		

C.V. = 12,45

Média geral = 74,5203125

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 7C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 24 horas.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	37	205165,227	5545,00615	520,878**
Resíduo	114	1213,5859	10,64549	
Total	151	206378,813		

C.V. = 16,79

Média geral = 19,4375

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 8C Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 24 horas.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	37	131421,747	3551,939116	60,08**
Resíduo	114	6739,72917	59,120431	
Total	151	138161,476		

C.V. = 48,43

Média geral = 15,8759868

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 9C Resumo da análise de variância da motilidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 48 horas.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	37	326649,397	8828,362088	196,156**
Resíduo	113	5085,76575	45,006777	
Total	150	331735,162		

C.V. = 24,83 Média geral = 27,0169536

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 10 C Resumo da análise de variância da mortalidade (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 48 horas.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	37	253935,78	6863,129435	78,431**
Resíduo	114	9975,60105	87,505272	
Total	151	263911,390		

C.V. = 38,33

Média geral = 24,4055263

Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}/100$.

TABELA 11C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 2 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	0,138486	0,017311	10,906**
Resíduo	18	0,02857	0,001587	
Total	26	0,167056		

C.V. = 17,02

Média geral = 0,2341107

Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}/100$.

TABELA 12C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 4 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	0,466515	0,058314	23,369**
Resíduo	18	0,044917	0,002495	
Total	26	0,511432		

C.V. = 11,83

Média geral = 0,4221179

Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}/100$.

TABELA 13C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 6 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	0,68883	0,086104	38,56**
Resíduo	18	0,040194	0,002233	
Total	26	0,729024		

C.V. = 9,62

Média geral = 0,4910979

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 14C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 8 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	0,949928	0,118741	22,554**
Resíduo	18	0,094766	0,005265	
Total	26	1,044694		

C.V. = 12,65

Média geral = 0,5735473

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 15C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 10 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	1,3136675	0,164209	36,412**
Resíduo	18	0,081176	0,00451	
Total	26	1,394851		

C.V. = 10,78

Média geral = 0,6228772

Dados transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$.

TABELA 16C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 12 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	1,440647	0,180081	57,683**
Resíduo	18	0,0561194	0,003122	
Total	26	1,496841		

C.V. = 8,39

Média geral = 0,6662529

Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}/100$.

TABELA 17C Resumo da análise de variância da eclosão (%) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em exsudatos de actinomicetos após 15 dias.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	8	1,948615	0,243577	34,308**
Resíduo	18	0,127794	0,0071	
Total	26			

C.V. = 10,8

Média geral = 0,7803873

Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x}/100$.