

**ASPECTOS DO ANTAGONISMO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A *Meloidogyne*
incognita EM TOMATEIRO**

RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

2008

RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

**ASPECTOS DO ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A
Meloidogyne incognita EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Pinho, Renata Silva Canuto de.

Aspectos do antagonismo de bactérias endofíticas a *Meloidogyne incognita* em tomateiro / Renata Silva Canuto de Pinho. -- Lavras : UFLA, 2008.

47 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. *Meloidogyne incognita*. 3. Bactérias endofíticas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.642996

RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

**ASPECTOS DO ANTAGONISMO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS A
Meloidogyne incognita EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de Fevereiro de 2008

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA

Prof. Dr. Denílson Ferreira de Oliveira - UFLA

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

DEDICO

Ao meu querido esposo Paulo, por todo amor e carinho.

OFEREÇO

Aos meus pais por terem me ensinado o valor dos estudos.

Aos meus irmãos, Flavia e Bruno, pela força e incentivo.

Aos meus sobrinhos Mariana, Luis Henrique, Mateus e Beatriz pela alegria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudo e de apoio técnico.

Ao professor Vicente Paulo Campos, pelo apoio, orientação e valiosos ensinamentos.

Aos professores Ricardo Magela de Souza e Denílson Ferreira de Oliveira pela orientação e sugestões na confecção da dissertação.

Aos professores do DFP, pelos valiosos conhecimentos transmitidos neste período.

A todos os funcionários do DFP, em especial ao grande amigo Tarlei Luiz de Paula.

Aos amigos, Jadir e Pedro, pela ajuda nas análises estatísticas.

Às estagiárias e amigas Giselle, Márcia e Lílian pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia: Fernando, Eduardo, Alex e Henrique.

À minha “nova família” Márcia, Grazi e Luciane.

Aos amigos que fiz durante meu curso de mestrado.

E a todos que contribuíram para a conclusão do trabalho.

OBRIGADA

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
ARTIGO 1: Efeito da Distância do Inóculo e do Armazenamento de Juvenil do Segundo Estádio na Presença ou Não de <i>Acinobacter johnsonii</i> nos Danos e Reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em Tomateiro	5
Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e métodos	9
Resultados e discussão	14
Referências bibliográficas	24
ARTIGO 2: Efeito de Bactérias Endofíticas no Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> e sua Relação com a Colonização de Raízes de Tomateiro	27
Resumo	28
Summary	29
Introdução	30
Material e métodos	32
Resultados e discussão	36
Literatura citada	45

RESUMO

PINHO, R. S. C. **Aspectos do antagonismo de bactérias endofíticas a *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. 2008. 47 p. Dissertação (Mestre em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Estudou-se neste trabalho o efeito de *Acinobacter johnsonii* na migração orientada do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* ao tomateiro e no armazenamento conjunto ou não de J2 e *A. johnsonii*. Foi também estudado o efeito de diversos isolados de bactérias endofíticas nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita*, e a relação desse antagonismo com a colonização de raízes de tomateiro. Os isolados de *A. johnsonii* adicionados ao substrato reduziram a migração de J2. Contudo, o parasitismo e reprodução de *M. incognita* foram sempre mais baixos quando o inóculo bacteriano foi colocado a 8 cm do centro. Com o tempo de estocagem de J2 com ou sem *A. johnsonii* ocorreu queda progressiva da reprodução e infectividade de J2 indicando que essa bactéria não foi patogênica a *M. incognita* e que o fator primordial, nesse ambiente, foi a queda progressiva da energia corporal pela movimentação desordenada do J2, a qual não é afetada pela presença da bactéria. A migração orientada caracterizou melhor o papel antagônico de *A. johnsonii* comparado com o ensaio de estocagem. Dos 39 isolados bacterianos endofíticos testados, 15 reduziram concomitantemente galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz e apenas três não colonizaram as raízes do tomateiro, correspondendo a 80% a relação entre o controle e a colonização de raízes. A relação entre a eficácia na redução de galhas, massas de ovos ou ovos por grama de raiz e colonização de raízes de tomateiro pelas bactérias endofíticas foi de 85%. As espécies que proporcionaram o melhor controle de *M. incognita* foram *Acinobacter johnsonii*, *Curtobacterium luteum*, *Bacillus pumillus* subg. B, *B. pumillus* e *B. amyloliquefaciens*, as quais colonizaram, também, as raízes de tomateiro. *A. johnsonii* (T 10), *S. aureus* (P 18), *P. gordonae* (T 47), *B. pumillus* (T 51) e o isolado P 11 (espécie não identificada) reduziram, também, a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro, segundo Silva (2004). O teste de colonização de raízes deve anteceder a seleção de bactérias candidatas ao antagonismo de fitonematóides.

¹ Orientador: Prof. Vicente Paulo Campos - UFLA

ABSTRACT

Pinho, Renata Silva Canuto de. **Aspects of the endophytic bacterium antagonism to *Meloidogyne incognita* of tomato.** 2008. 47 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras.¹

The effect of *Acinobacter johnsonii* on the oriented migration of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita* toward tomato roots and on the J2 storage, simultaneously, or not with *A. johnsonii* was studied. It was, also, studied the effect of several endophytic bacterium isolates on the damage and reproduction of *M. incognita*, as well as the relationship of those antagonisms to tomato root colonization. Any *A. johnsonii* isolates added to the substrate reduced the J2 migration. However, the parasitism and reproduction of *M. incognita* were always lower when bacterium inoculum was poured at 8 cm from the circle center. During J2 storage period with or not *A. johnsonii*, the reproduction and infectivity of J2 decreased progressively indicating that this bacterium was not pathogenic to *M. incognita* and that the major factor, in this environment, was the progressive decrease on the J2 body energy by erratic J2 movement. Migration experiment better characterized the antagonism of *A. johnsonii* to *M. incognita* compared to storage experiment. From 39 endophytic bacterial isolates tested, fifteen of them reduced, simultaneously, gall, egg-masses and eggs per gram of roots, but, only, three of them did not colonized tomato roots corresponding 80% the relationship between control and root colonization. This relationship increased to 85% when considered, separately, the three measurements of control efficacy. The species that gave better control of *M. incognita* were: *Acinobacter johnsonii* (T 9 e T10), *Curtobacterium luteum* (P 16), *Bacillus pumillus* subg. B (T 27), *B. pumillus* (T 26) e *B. amyloliquefaciens* (T 36) which colonized, also, the tomato roots. *A. johnsonii* (T 10), *S. aureus* (P 18), *P. gordonae* (T 47), *B. pumillus* (T 51) and isolate P 11 (unidentified species) reduced, also, the disease severity caused *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato according to Silva (2004). The root colonization test should precede every bacterial screening for antagonism to plant parasitic nematodes.

¹ Adviser: Vicente Paulo Campos - UFLA

INTRODUÇÃO GERAL

A busca por bactérias antagonistas a fitonematóides tem se intensificado nas últimas décadas com maior ênfase para as endofíticas, já que tem capacidade de colonizar os tecidos internos do hospedeiro e promoverem o crescimento de plantas (PGPR), (Siddiqui et al. 2003). Bactérias com amplo espectro de antagonismo aos patógenos de plantas podem ter maior potencial de utilização na agricultura.

No solo o inóculo infectivo de *Meloidogyne* spp. nem sempre está no local de infecção, isto é, no meristema apical das raízes. Porém, o juvenil do segundo estágio (J2), forma infectiva de *Meloidogyne* spp., possui movimento e reserva energética corporal que possibilita movimentar-se e chegar ao local de penetração. Em temperatura elevada, isto é, $\pm 28^{\circ}$ C, o J2 movimenta-se muito atraído por diversos fatores, perdendo, dessa forma, grande parte da energia corporal acumulada durante sua ontogenia levando à perda da capacidade parasítica (Christophers et al., 1997; Campos et al.; 2006; Rocha, 2007).

A migração e o armazenamento de J2 de *Meloidogyne* spp. têm sido estudados *in vitro* e em casa-de-vegetação em solo esterilizado (Campos et al., 2006; Freire, et al., 2007, Rocha, 2007). Contudo, na natureza não existe cultura pura. A presença de bactérias endofíticas e rizobactérias no solo por onde o J2 irá movimentar-se em direção à raiz precisa ser estudada quanto ao seu efeito no parasitismo desse J2.

A relação alimentar da bactéria endofítica com a planta, sem causar doença, pode ocorrer pelo apoplasto e pelos exsudatos. Kloepper et al. (1992) demonstraram a multiplicação de bactérias endofíticas no apoplasto sem causar doença na planta. A partir de então aumentou o interesse dos pesquisadores na visualização da colonização do sistema radicular, buscando assim criar mais um critério para seleção de bactérias endofíticas antagonistas a patógenos do sistema

radicular. Vários métodos têm sido empregados no estudo *in vitro* da colonização de raízes por bactérias como o uso de Phytigel® (Queiroz et al., 2006), ágar Noble (Habe et al., 2000) e ágar-ágar (Romeiro et al., 1999). Devido à simplicidade, esses métodos facilitam a seleção de um grande número de isolados rizobacterianos (Queiroz et al., 2006).

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho estudar: a) o efeito de *Acinobacter johnsonii* adicionado ao substrato nos danos e reprodução de *M. incognita* em tomateiro após a migração ou estocagem do J2; b) ampliar o espectro de ação de bactérias endofíticas isoladas de caules e hastes de tomateiro e pimentão e o efeito delas nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* bem como na relação do antagonismo com a colonização de raízes de tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 387-393, jul./ago. 2006.
- CHRISTOPHERS, A. E. P.; PATEL, M. N.; BENSON, J. A.; SAKA, V. W. ; EVANS, A. A. F.; WRIGHT, D. J. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120, Jan. 1997.
- FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R.; ROCHA, F. S.; SILVA, J. R. C.; POZZA, E. A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 270-274, jul./set. 2007.
- HABE, M. H.; UESUGI, C. H. Métodos *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 657-660, jul./ago. 2000.
- KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 139, N. 1, p. 75-84, jan. 1992.
- QUEIROZ, B. P. V.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MELO, I. S. Visualização *in vitro* da colonização de por rizobactérias. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 95-97, jan./mar. 2006.
- ROCHA, F. S. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne***. 2007. 148 p. Tese (Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ROMEIRO, R. S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H.; MOURA, A. B.; SILVA, H. S. A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e sua implicação na indução de resistência

sistêmica e enfermidades e na promoção do crescimento de plantas.
Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 24, p. 255, ago. 1999. Suplemento.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Endophytic bacteria: prospects and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes.
Nematologia Mediterrânea, Pisa, v. 31, n. 1, p. 111-120, June 2003.

ARTIGO 1

Efeito da Distância do Inóculo e do Armazenamento de Juvenil do Segundo Estádio na Presença ou Não de *Acinobacter johnsonii* nos Danos e Reprodução de *Meloidogyne incognita* em Tomateiro

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira”)

Renata S. C. Pinho¹, Vicente P. Campos¹, Juliana, R. C. Silva², Giselle C. S. Pimentel¹, LÍlian S. A. S. Costa¹, Márcia S. Oliveira¹, Ricardo M. Souza¹.

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa postal 3037, Lavras, MG, Brasil, e-mail: canutors@yahoo.com.br; ² Campos Carregal Pesquisa e Tecnologia Agrícola LTDA, Rua CL3, Quadra C, Lote 23 – Residencial Lausane, CEP 75907-454, Rio Verde, GO, Brasil.

(Aceito para publicação em / /)

Autora para correspondência: Renata S. C. Pinho

Pinho, R. S. C., Campos, V. P., Silva, J. R. C., Pimentel, G. C. S., Costa, L. S. A. S., Oliveira, M. S., Souza, R. M. Efeito da distância do inóculo e do armazenamento de juvenil do segundo estágio na presença ou não de *Acinobacter johnsonii* nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

Espécies bacterianas e seus metabólitos afetam o parasitismo e reprodução de *Meloidogyne* spp. de formas, ainda, desconhecidas. Foram realizados dois experimentos com o objetivo de estudar o efeito de *Acinobacter johnsonii* na migração orientada do juvenil do segundo estágio (J2) ao tomateiro e no armazenamento conjunto ou não de J2 e *A. johnsonii*. Para o ensaio de migração, quatro mudas de tomateiro, envoltas em telas excludoras de raízes, foram dispostas em um círculo com 8 cm de raio. No centro, foram colocados 5000 J2 de *Meloidogyne incognita*. Dez mL de cada suspensão bacteriana foram colocados a três distâncias do J2: 0, 4 e 8 cm. Para o ensaio de armazenamento, em copos contendo substrato composto de solo e areia (1:1), foi feita uma cova e colocados 200 J2 concomitantemente ou não com suspensão de *A. johnsonii*. Após 0, 24, 48, 72 e 96 horas, para cada copo, transplantou-se uma muda de tomateiro. Trinta dias após foram avaliados o número de galhas, massas de ovos e de ovos por sistema radicular, para os dois ensaios. Todos os isolados de *A. johnsonii* adicionados ao substrato reduziram ($P \leq 0,05$) a migração de J2. Contudo, o parasitismo e reprodução de *M. incognita* foram sempre mais baixos quando o inóculo bacteriano foi colocado a 8 cm do centro. Com o tempo de estocagem de J2 com ou sem *A. johnsonii*, ocorreu queda progressiva da reprodução e infectividade de *M. incognita* indicando que essa bactéria não foi patogênica ao nematóide e que o fator primordial, nesse ambiente, foi a queda progressiva da energia corporal pela movimentação desordenada do J2, a qual não é afetada pela presença da bactéria. A migração orientada caracterizou melhor o papel antagônico de *A. johnsonii* comparado com o ensaio de estocagem.

Palavras – chave adicionais: controle biológico, nematóide das galhas, bactérias endofíticas, migração, estocagem.

ABSTRACT

Effect of inoculum distance to the host, storage of second stage juveniles at the presence or not of *Acinobacter johnsonii*, on the damage and reproduction of *Meloidogyne incognita* in tomato

Bacterium species and their metabolites affect the parasitism and reproduction of *Meloidogyne* spp. at different ways which needs to be clarified. Two experiments were done to study the effect of *Acinobacter johnsonii* on the oriented migration of second stage juveniles toward tomato roots and on the J2 storage with or not *A. johnsonii*. For the migration experiment, four tomato seedlings, each one with root wrapped up by net to avoid root to grow toward J2, were transplanted at distance of 8 cm of ray forming a circle. In the circle center were placed 5000 J2 of *Meloidogyne incognita*. Ten mL of each bacterium suspension were poured at three J2 distances: 0, 4 and 8 cm away. For the storage experiment, in each cup with substrate, a hole was dug in the middle where 200 J2 were poured simultaneously with *A. johnsonii* suspension or not. After 0, 24, 48, 72 and 96 hours, one tomato seedling was transplanted to each cup. Thirty days later, were evaluated the number of galls, egg masses and egg of *M. incognita* per root systems, for the two experiments. All *A. johnsonii* isolates added to the substrate reduced the J2 migration. However, the parasitism and reproduction of *M. incognita* were always lower when bacterium inoculum was poured at 8 cm from the circle center. During J2 storage period with or not *A. johnsonii*, the reproduction and infectivity of *M. incognita* decreased progressively indicating that this bacterium was not pathogenic to nematode and that the major factor, in this environment, was the progressive decrease on the J2 body energy by erratic J2 movement. Migration experiment better characterized the antagonism of *A. johnsonii* to *M. incognita* compared to storage experiment.

Additional Keywords - Biological control, root-knot nematode, endophytic bacteria, migration, storage.

INTRODUÇÃO

No solo o inóculo infectivo de *Meloidogyne* spp. nem sempre está no local de infecção, isto é, no meristema apical das raízes. Porém, o juvenil do segundo estágio (J2), forma infectiva de *Meloidogyne* spp., possui movimento e reserva energética corporal que o possibilita chegar ao local de penetração. Em temperatura elevada, isto é $\pm 28^{\circ}$ C, o J2 movimenta-se muito atraído por diversos fatores, perdendo, dessa forma, grande parte da energia corporal acumulada durante sua ontogenia, levando-o à perda da capacidade parasítica (Christophers et al., 1997; Campos et al.; 2006; Rocha, 2007).

A migração e o armazenamento de J2 de *Meloidogyne* spp. têm sido estudados *in vitro* e em casa-de-vegetação em solo esterilizado (Campos et al., 2006; Freire, et al., 2007, Rocha, 2007). Contudo, na natureza não existe cultura pura. A presença de bactérias endofíticas e rizobactérias no solo por onde o J2 irá movimentar-se em direção à raiz, precisa ser estudada quanto ao seu efeito no parasitismo desse J2.

Muitos isolados ou espécies rizobacterianas e endofíticas têm comprovada capacidade de afetar a mobilidade de J2 de *Meloidogyne* spp., chegando a causar alta mortalidade *in vitro* (Carneiro, et al., 1998; Naves et al., 2004; Coimbra et. al., 2005). *Acinobacter johnsonii* causa *in vitro* mortalidade e afeta a mobilidade de *Meloidogyne incognita* (Pinho et al., 2008). Contudo, ainda não se sabe como este antagonismo ao J2 pode afetá-lo no solo, principalmente durante o armazenamento e o direcionamento em relação ao local de infecção no hospedeiro. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito de *Acinobacter johnsonii* adicionado ao substrato nos danos e reprodução de *M. incognita* em tomateiro após a migração ou estocagem do J2.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Efeito da distância entre juvenis de segundo estágio e as raízes de tomateiro na presença ou não de *Acinobacter johnsonii* nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro

Para realização do ensaio, foram utilizados três isolados de *Acinobacter johnsonii*, denominados de BAC 1, BAC 9 e BAC 10. Todos eles são bactérias endofíticas obtidas em trabalhos anteriores, isoladas de caule e hastes de tomateiro (Silva, 2004).

Obtenção de mudas de tomateiro: sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv Kada) foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, contendo substrato Plantmax[®], mantidas em sala climatizada com temperatura de ± 27 °C e fotoperíodo de 12h. Após sete dias foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por célula. As mudas foram usadas no ensaio aos 15 dias da semeadura.

Preparo do inóculo bacteriano: os isolados de bactérias endofíticas preservados em meio líquido peptona-glicerol em “freezer” a -80 °C, foram transferidos para as placas de Petri contendo meio “tryptic soy Agar” (TSA) e incubados a 28 °C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com os isolados bacterianos, adicionando-se às placas solução salina (NaCl a 0,85%) e homogeneizando-as com alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada, em espectrofotômetro, para $A_{540nm}=0,5$.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*: ovos de *M. incognita* foram extraídos de raízes de tomateiro, mantidas em casa-de-vegetação, através da técnica proposta por Hussey & Barker (1973). As raízes foram cuidadosamente lavadas e cortadas em pedaços de 1 cm de comprimento e, em seguida, trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras de 0,075 mm sobre 0,038 mm de abertura. O material retido na peneira de 0,038 mm foi coletado num becker com uma pisseta com água, completando-se todo processo em 2 minutos. Em seguida, colocaram-se aproximadamente 3g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em becker de 500 mL, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Para obtenção dos J2, utilizou-se uma câmara de eclosão formada com tela de 0,35 µm de espessura, colocados num funil de vidro. Foram utilizados no ensaio apenas J2 obtidos no terceiro dia. A suspensão de J2 foi calibrada para 1000 J2/mL.

Montagem e avaliação: o ensaio foi realizado em caixas de madeira de 1 m² e 15 cm de altura com substrato composto de solo e areia na proporção de 1:1, previamente esterilizado por solarização. Nessas caixas, quatro mudas de tomateiro envoltas em telas excludoras de raízes com 85 µm de poro foram dispostas em círculo com 8 cm de raio, formando uma unidade experimental. As telas excludoras foram utilizadas em cada planta para evitar o crescimento da raiz em direção ao nematóide, sendo o espaço ocupado por cada sistema radicular de 0,064 dm³. No centro, dez dias após o transplântio das mudas, foram colocados 5000 J2 de *M. incognita*, ou seja, a 8 cm de distância de cada tomateiro. Dez mL de cada suspensão bacteriana foi colocada a três distâncias do J2: 0 cm (no mesmo local onde foram colocados os J2), na metade da distância (4 cm) entre o centro e as mudas transplantadas em que 10 mL da

suspensão foi colocada em um arco em frente as mudas, e a 8 cm do centro coincidindo com o local de transplântio das mudas que receberam também 10 mL da suspensão por muda (Figura 1). Como testemunhas uma planta foi inoculada com 5000 J2 colocados na rizosfera, a 2 cm de profundidade, próximos ao colo das plantas (Testemunha 1) e J2 foram colocados no centro, sem a aplicação da suspensão bacteriana, a 8 cm dos tomateiros (Testemunha 2).

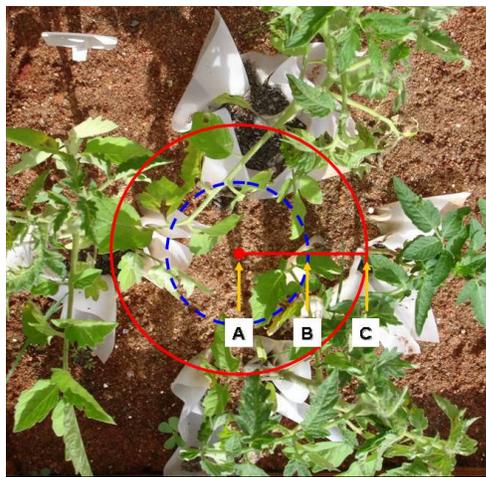


Figura 1. Disposição em círculo dos tomateiros envolvidos em telas excludoras de raízes e locais de aplicação das bactérias endofíticas (A = local de adição dos juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*; A, B e C locais de aplicação das bactérias).

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 3 + 2, sendo estudados três isolados bacterianos e três pontos de inoculação da suspensão bacteriana (0, 4 e 8 cm) em relação a *M. incognita*, mais 2 tratamentos adicionais (testemunhas) que consistiram na colocação do J2 no centro sem aplicação da suspensão bacteriana e da inoculação do J2 na rizosfera, em 4 repetições.

Trinta dias após, foi avaliado o número de galhas, bem como massas de ovos e ovos por sistema radicular, nas quatro plantas da unidade experimental. O cálculo de porcentagem de migração dos J2 foi realizado com base na testemunha 1.

Os dados de galhas e massas de ovos e ovos por grama de raiz foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. A análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de significância.

2- Efeito do armazenamento de juvenis de segundo estágio na presença ou não de *Acinobacter johnsonii* nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

Para realização do ensaio foram utilizados dois isolados de *Acinobacter johnsonii*, denominados BAC 1 e BAC 9.

Foram preparadas as mudas de tomateiro da cultivar Kada e obtidos os juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, bem como as suspensões bacterianas dos isolados.

Montagem e avaliação: para montagem do ensaio foram utilizados copos plásticos de 300 mL contendo substrato composto de solo e areia na proporção de 1:1, previamente esterilizado por solarização. No centro do copo com substrato foi colocado um molde de gesso revestido de parafina, de tamanho equivalente ao da célula da bandeja de tomateiro ($\pm 0,064 \text{ dm}^3$), formando uma cova (Freire et al., 2007). Nessa cova foram colocados os J2 concomitantemente ou não com as bactérias endofíticas. Cerca de 200 J2 foram colocados por copo consistindo em um tratamento (J2). Em outro tratamento, os 200 J2 foram misturados aos 10 mL da suspensão bacteriana (J2SB). No terceiro tratamento,

os J2 foram pipetados no substrato e, a seguir, colocaram-se 10 mL da suspensão bacteriana (J-B).

A seguir, os copos foram armazenados em sala climatizada com temperatura de ± 27 °C e alta umidade por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Diariamente borrifava-se água nas paredes do copo. Ao final de cada período de armazenamento transplantou-se uma muda de tomateiro para a cova em cada copo. As mudas transplantadas nos copos foram colocadas à temperatura de ± 27 °C e fotoperíodo de 12 h.

Trinta dias após as inoculações foram avaliados: número de galhas, massas de ovos e de ovos por sistema radicular. Cada planta foi retirada e cortada na altura do coleto para separação da parte aérea e raízes. Após separadas da parte aérea, as raízes foram lavadas em água parada e secas com papel absorvente. A contagem das galhas foi feita visualmente em todo o sistema radicular. Para contagem das massas de ovos foi realizada sua coloração em solução contendo corante artificial, empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Em seguida, todo sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5 cm de comprimento e os ovos extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram quantificados ao microscópio estereoscópico.

Delineamento experimental: os tratamentos foram dispostos em delineamento em blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ajustes de regressão, cujas equações foram ajustadas às variáveis dependentes, em função do tempo de transplante das mudas. Os critérios para escolha dos modelos de regressão foram aqueles que apresentaram maior coeficiente de determinação, significância dos coeficientes de regressão até 5% de probabilidade, pelo teste F e significado biológico. As análises foram realizadas pelo programa Sisvar (Ferreira, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre a distância de colocação da bactéria *Acinobacter johnsonii* e os diferentes isolados, bem como o efeito entre isolados de *A. johnsonii* não foram significativos. Contudo, qualquer um dos isolados bacterianos adicionados ao substrato reduziu significativamente a migração de juvenis do segundo estágio (J2), aqui caracterizado pelo número de massas de ovos por sistema radicular, pois observou-se mais de uma fêmea por galha, e conseqüentemente os danos expressos pelo número de galhas em comparação ao número de J2 em substrato sem *A. johnsonii* (Testemunha 2). A reprodução (ovos/ sistema radicular) na presença ou não da bactéria não diferiram entre si após a migração dos J2 por 8 cm mas foi cinco vezes maior quando os J2 foram inoculados na rizosfera (Testemunha 1). Também foram maiores ($P \leq 0,05$) os danos e a população de J2 dentro nas raízes expressos por massa de ovos quando J2 foram colocados na rizosfera (Testemunha 1) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de três isolados (BAC 1, 9 e 10) de *Acinobacter johnsonii* na migração de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, expresso pela porcentagem de galhas, massas de ovos e ovos por sistema radicular comparados à testemunha 1 (inoculação do J2 na rizosfera).

Bactérias	Galhas / sistema radicular (%)	Massas de ovos / sistema radicular (%)	Ovos / sistema radicular (%)
Testemunha 1*	100,00 c	100,00 c	100,00 b
Testemunha 2**	44,75 b	60,25 b	20,75 a
BAC 1	14,00 a	25,83 a	12,25 a
BAC 9	16,58 a	32,25 a	17,58 a
BAC 10	13,91 a	22,92 a	9,00 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. * J2 inoculado na rizosfera. ** J2 inoculado a 8 cm das plantas de tomateiro.

A bactéria *A. johnsonii* colocada a 8 cm do centro, isto é, no mesmo local onde foram transplantadas as mudas de tomateiro, reduziu ($P \leq 0,05$) o número de J2 na raiz, expresso pelo número de massas de ovos, comparado com os demais locais de adição da bactéria e com a testemunha 2 sem bactéria e testemunha 1, inoculação de J2 na rizosfera. A inoculação de J2 na rizosfera (Testemunha 1) proporcionou maior número de J2 dentro da raiz. A reprodução, ovos por sistema radicular foi igualmente reduzida ($P \leq 0,05$), quando *A. johnsonii* foi colocada a 4 e 8 cm de distância comparada aos demais tratamentos, porém, sempre a inoculação de J2 na rizosfera (Testemunha 1) proporcionou maior ($P \leq 0,05$) reprodução (Tabela 2).

O número de galhas não diferiu entre as distâncias de colocação de *A. johnsonii*, mas as distâncias diferiram das testemunhas 1 e 2 (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da distância de colocação da bactéria *Acinobacter johnsonii* (0, 4 e 8 cm) na migração de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, expresso pela porcentagem de galhas, massas de ovos e ovos por sistema radicular comparados à testemunha 1 (inoculação do J2 na rizosfera).

Distância (cm)	Galhas / sistema radicular (%)	Massas de ovos / sistema radicular (%)	Ovos sistema radicular (%)
Testemunha 1*	100,00 b	100,00 c	100,00 c
Testemunha 2**	44,75 b	60,25 b	20,75 b
0	17,00 a	32,83 b	19,67 b
4	18,25 a	34,50 b	11,41 a
8	9,25 a	13,67 a	7,75a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$. * J2 inoculado na rizosfera. ** J2 inoculado a 8 cm das plantas de tomateiro.

Embora a análise conjunta do efeito da colocação dos isolados de *A. johnsonii* não fosse significativa (Tabela 1), o isolado BAC 10 teve comportamento diferente dos demais em relação ao número de J2 que obteve sucesso no parasitismo expresso por massas de ovos e ovos por sistema radicular. O isolado BAC 10 colocado a 4 e 8 cm reduziu ($P \leq 0,05$) o número de J2 com sucesso no parasitismo em relação à colocação no centro (0) e todas as distâncias de colocação do inóculo reduziram igualmente ($P \leq 0,05$) o número de ovos (Figura 2). Contudo, para os demais isolados o número de J2 com sucesso no parasitismo e reprodução, ovos por sistema radicular, foram sempre mais baixos quando o inóculo bacteriano foi colocado a 8 cm, ou quando o BAC 1 foi colocado a 4 cm do centro (Figura 2).

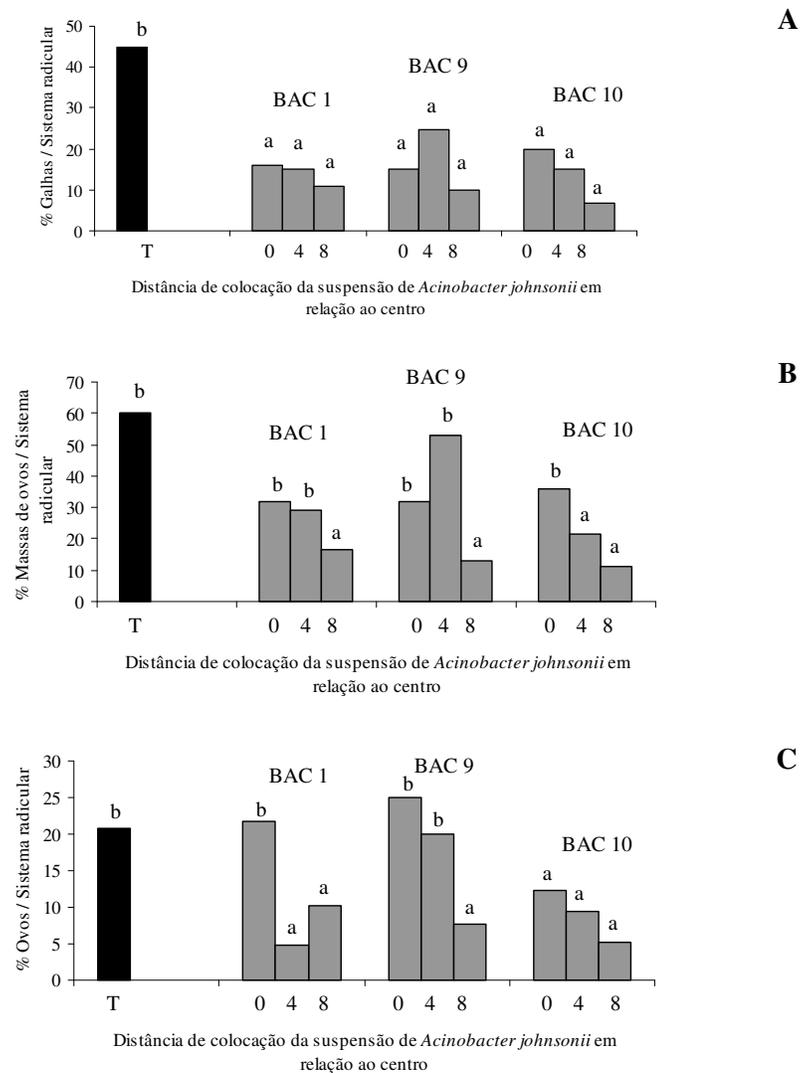
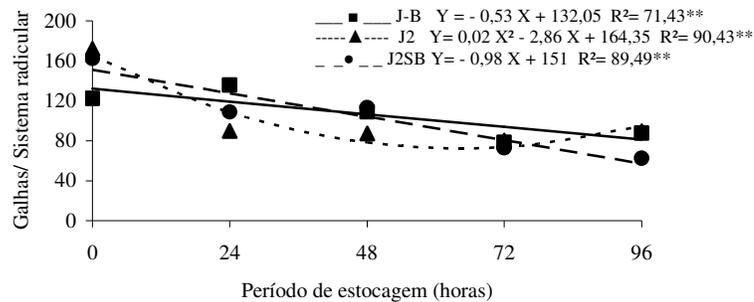
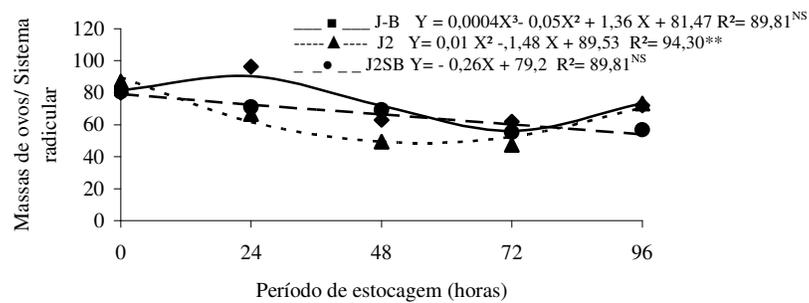


Figura 2. Número de galhas de *Meloidogyne incognita* (A) massa de ovos (B) e de ovos (C) por sistema radicular do tomateiro, expresso em porcentagem do ocorrido no tratamento testemunha em que os J2 foram inoculados na rizosfera. Os juvenis do segundo estágio migraram, do centro (0) até 8 cm de distância pelo substrato com ou sem os isolados de *Acinobacter johnsonii* colocados a 0 (centro), 4 e 8 cm distância. T= testemunha sem adição de *A. johnsonii*. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

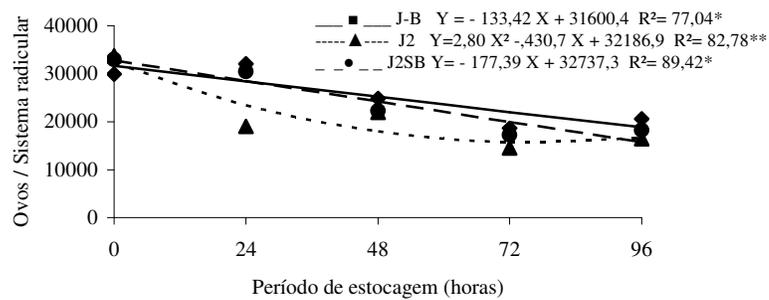
A estocagem do J2 de *Meloidogyne incognita* no substrato com e sem *A. johnsonii* proporcionou redução no sucesso do parasitismo de J2 expresso por massas de ovos e na reprodução, ovos / sistema radicular e número de galhas durante o período (Figuras 3 e 4). Quando o isolado BAC 9 de *A. johnsonii* foi misturado ao J2 e armazenado no solo por 24, 48 e 72 horas, ocorreu maior redução no número de massa de ovos e ovos por sistema radicular comparado ao J2 armazenado no substrato sem *A. johnsonii* e com o J2 colocado no solo seguido do isolado (Figura 4). Entretanto, essa redução não ocorreu com o isolado BAC 1 (Figura 3). Às 96 horas de estocagem dos J2 em substrato com e sem *A. johnsonii* a redução no número de galhas, massas de ovos e ovos por sistema radicular foi igualmente elevada para os três tratamentos (Figuras 3 e 4).



A

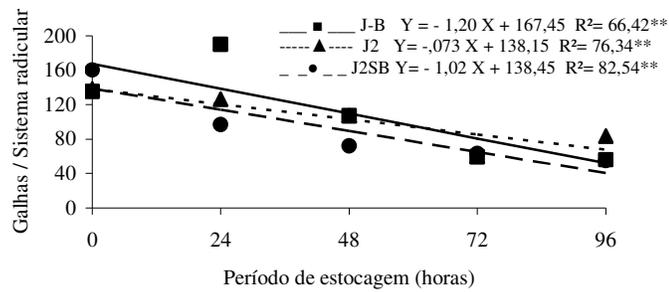


B

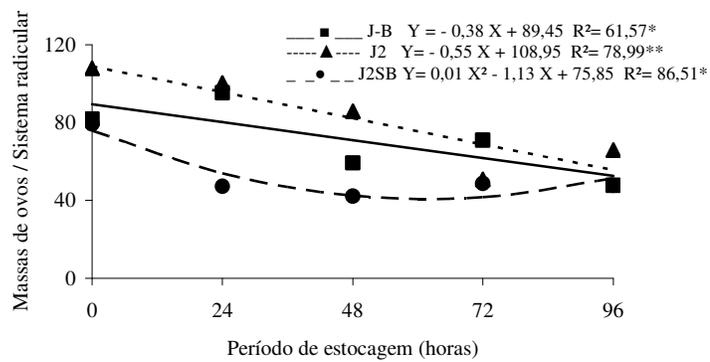


C

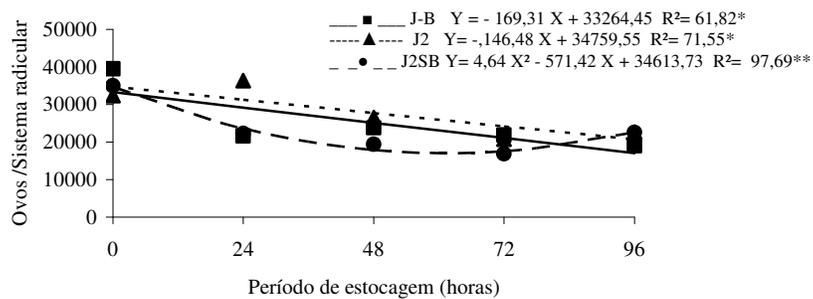
Figura 3. Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* sem a presença de *Acinobacter johnsonii* (BAC 1) (J2 - - -▲- -) comparado com o armazenamento de J2 mais suspensão bacteriana (J2SB - - ● - -) e com a colocação dos J2 e em seguida a suspensão bacteriana de (J-B - - ■ - -) no A) número de galhas, B) número de massas de ovos, C) número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular.



A



B



C

Figura 4. Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* sem a presença de *Acinobacter johnsonii* (BAC 9) (J2 -----▲-----) comparado com o armazenamento de J2 mais suspensão bacteriana de (J2SB _ _●_ _) e com a colocação dos J2 e em seguida a suspensão bacteriana de (J-B _ _■_ _) no A) número de galhas, B) número de massas de ovos, C) número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular.

A redução média de galhas de *M.incognita* resultante do período de estocagem do J2 (96 h) misturado com o isolado BAC 9 no substrato, J2 seguido da adição da bactéria e do J2 sem a bactéria foi, respectivamente, 65,8%, 58,5% e 56,7%; para ovos foi de 47,7%, 41,7% e 56,1%, respectivamente. Os J2 estocados da mesma forma com o isolado BAC 1 proporcionaram reduções de 62,5%, 36,1% e 53,4%, respectivamente, para galhas e de 51,9%, 51,8% e 43,0% para ovos, respectivamente.

A redução de, aproximadamente, 40% na migração do J2 em substrato sem *A. johnsonii* e de aproximadamente 80% na reprodução de *M. incognita* em tomateiro (Tabela 2) indica que a movimentação do J2 à distância de 8 cm leva-o à perda da infectividade e reprodução, pela redução da energia corporal. Christophers et al. (1997) e Van Gundy et al. (1967) constataram que a redução de 50% do teor de lipídio corporal reduz a infectividade. Prot & Van Gundy (1981) observaram migração de 31,5% de J2 de *M. incognita* por 20 cm até a raiz de tomateiro em tubos de PVC de cm de diâmetro. Na presença de *A. johnsonii* a migração do J2 foi possível para, aproximadamente, 34% da população (Tabela 2).

A redução na penetração de J2 e no número de galhas em tomateiro após a migração em substrato infestado pelos isolados de *A. johnsonii* (Tabela 1) demonstrou o antagonismo dessa bactéria à *M. incognita* pela perda do direcionamento ao hospedeiro pelo J2 ou pelos efeitos tóxicos irreversíveis ao J2 pelos metabólitos bacterianos. Entretanto, como a bactéria durante o armazenamento não afetou significativamente os J2, ao que tudo indica *A. johnsonii* impossibilitou o J2 de encontrar o direcionamento ao tomateiro. Noutro artigo, em que se avaliou o antagonismo desses isolados de *A. johnsonii* *in vitro*, observou-se redução de 88,75% da mobilidade e aumento de 89,75% de mortalidade de J2 de *M. incognita* comparados aos J2 colocados em água (Pinho et al., 2008). Oliveira et al. (2008) encontraram mais de 90% de mortalidade de

J2 de *M. javanica in vitro* em contato com filtrados de *A. johnsonii*. Dessa forma, os dados aqui obtidos sobre a migração de J2 em substrato com *A. johnsonii* criam uma expectativa para viabilidade de desenvolvimento de uma rizosfera supressiva com a inoculação de *A. johnsonii*, como comentado por Mazzola (2007) sobre a manipulação de comunidades bacterianas da rizosfera. Possibilidade essa que aumenta quando se observa nos dados (Tabela 2) que a inoculação na rizosfera do tomateiro (8 cm) tornou os isolados mais agressivos, fato explicado pela capacidade desses isolados de *A. johnsonii* de colonizar *in vitro* a rizosfera do tomateiro, como demonstrado por Pinho et al. (2008). Mas o isolado BAC 10, ao que tudo indica, deve produzir substâncias diferentes ou colonizar mais rapidamente o substrato os quais afetam a migração de *M. incognita*, mesmo colocada distante do hospedeiro reduzindo a reprodução desse nematóide (ovos / sistema radicular) (Figura 2C). Outras espécies bacterianas, mesmo não demonstrando antagonismo *in vitro* a fitonematóides, precisam ser estudadas quanto ao efeito da migração do J2 de *Meloidogyne* spp. em substrato. Isso concorrerá para a ampliação do conhecimento sobre comunidades bacterianas do solo e a migração do J2 uma vez que já existe grande volume de estudos de migração em culturas puras de J2. Esses resultados aproximar-se-ão do efeito rizosférico em que envolve sempre a multiplicidade de organismos. Privilegiar uma comunidade bacteriana antagônica à fitonematóides favorecida pelo crescimento no apoplasto e em exsudatos de determinado hospedeiro constitui busca direcionadora de pesquisas sobre controle de fitonematóides com rizobactérias no campo.

Com o tempo de estocagem de J2 com ou sem *A. johnsonii* ocorreu a queda progressiva da reprodução e infectividade de *M. incognita* (Figuras 3 e 4) indicando que essa bactéria não é patogênica a ele e que o fator primordial nesse ambiente é a queda progressiva da energia corporal pela movimentação

desordenada do J2 na ausência do hospedeiro, a qual não é afetada pela presença da bactéria.

A migração orientada caracterizou melhor o papel antagonico de *A. johnsonii* comparado ao ensaio de estocagem.

O armazenamento de J2 no solo ou em água em alta temperatura (28°C) reduz a energia corporal e conseqüentemente a infectividade. Rocha (2007) estudou a perda de energia corporal de J2 de *M. incognita* quando armazenado em água por 0, 3, 6, 9 e 12 dias a 28°C, e correlacionou-a com a redução da infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro. Maior período de armazenamento aumentou a perda de energia e reduziu infectividade e reprodução de J2 de *M. incognita* em tomateiro. Freire et al. (2007) verificaram que a infectividade em tomateiro dos J2 de *M. incognita* estocados no solo Neossolo Quartzarênico decresceu significativamente a 28°C durante 6 dias, chegando a aproximadamente 98% de redução a partir de 4 dias de estocagem.

Porém, estudos precisam avançar no sentido de caracterizar o papel de bactérias endofíticas e rizobactérias nas diversas fases da ontogenia e nos eventos que levam ao sucesso de parasitismo de J2 de *Meloidogyne* em seus hospedeiros.

Em conclusão, *A. johnsonii* afeta a migração do J2 de *M. incognita* em direção ao tomateiro resultando em menos infectividade e reprodução. Contudo, na estocagem o efeito de *A. johnsonii* nos danos e reprodução de *M. incognita* não foi expressivo. Portanto, a migração orientada caracterizou melhor o papel antagonico de *A. johnsonii* comparado com o ensaio de estocagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 387-393, jul./ago. 2006.

CARNEIRO, R. M. D. G.; SOUZA, I. S.; BELARMINO, L. C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 12-21, Jun. 1998.

CHRISTOPHERS, A. E. P.; PATEL, M. N.; BENSON, J. A.; SAKA, V. W.; EVANS, A. A. F.; WRIGHT, D. J. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120, jan.1997.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 2, p. 88-95, maio/ago. 2005.

COOLEN, W. A.; C. J. D'HERDE. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR – **Sistema de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R.; ROCHA, F. S.; SILVA, J. R. C.; POZZA, E. A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, n. 3, v. 33, p. 270-274, jul./set. 2007.

HUSSEY, R. S.; K. R. BARKER. 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.

MAZZOLA, M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. **Journal of Nematology**, Hanover, n. 3, v. 39, p. 213-220, Sep. 2007.

NAVES, R. L.; CAMPOS V. P.; SOUZA, R. M.. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 384-388, jul./ago. 2004.

OLIVEIRA, A. S.; CAMPOS, V. P.; SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M. **Controle de *Meloidogyne javanica* com bactérias endofíticas e avaliação de métodos de inoculação, em tomateiro**. Lavras, 2008. Não publicado.

PINHO, R. S. C.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F.; ROCHA, F. S.; SILVA, J. R. C. **Efeito de filtrados rizobacterianos e endofíticos liofilizados e sem aminoácidos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita***. Lavras, 2008. Não publicado.

PROT, J. C.; GUNDY, S. D. van. Effect of soil texture and clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 213-217, Apr. 1981.

ROCHA, F. S.; MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 293-297, dez. 2005.

ROCHA, F. S. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne***. 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SILVA, J. R. C. **Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*) bacterianas do tomateiro**. 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VAN GUNDY, S. D., BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June. 1967.

ARTIGO 2

Efeito de Bactérias Endofíticas no Controle de *Meloidogyne incognita* e sua Relação com a Colonização de Raízes de Tomateiro*

(Preparado de acordo com as normas da revista “Nematologia Brasileira”)

Renata S. C. Pinho¹, Vicente P. Campos^{1, 2}, Juliana, R. C. Silva³, Márcia S. Oliveira², Giselle C. S. Pimentel², Lílian, S. A. S. Costa², Ricardo M. Souza^{1, 2}.

*Parte da Dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras para a obtenção do título de Mestre, ¹Bolsista do CNPq, ²Universidade Federal de Lavras, Depto. de Fitopatologia, 37200-000, Lavras, MG, ³Campos Carregal Pesquisa e Tecnologia Agrícola LTDA, Rua CL3, Quadra C, Lote 23 – Residencial Lausane, 75907-454, Rio Verde, GO.
E-mail: canutors@yahoo.com.br.

Resumo – Pinho, R. S. C., Campos, V. P., Silva, J. R. C., Oliveira, M. S., Pimentel, G. C. S., Costa, L. S. A. S., Souza, R. M. 2008. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua relação com a colonização de raízes de tomateiro.

Visando ampliar o espectro de biocontrole de bactérias isoladas de caule e hastes de tomateiro e pimentão e investigar a relação com raízes, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito dessas bactérias nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* e a relação desse antagonismo com a colonização de raízes de tomateiro pela técnica do Phytigel[®]. Para isso, sementes de tomateiro foram microbiolizadas em suspensões bacterianas ajustadas para $A_{540nm}=0,5$ por 24 horas. A seguir, as sementes inoculadas foram semeadas em copos de 300 mL com substrato Plantmax[®]. Aos quinze dias, as mudas foram inoculadas com 400 ovos de *Meloidogyne incognita* e colocadas em sala climatizada com temperatura de ± 27 °C e fotoperíodo de 12h. Trinta dias após, avaliou-se o número de galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz. No ensaio de colonização, as sementes microbiolizadas em suspensões bacterianas foram colocadas para germinar em tubos de ensaio estéreis, contendo Phytigel[®] (0,8%). Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento sem luz, a 28°C. As avaliações consistiram de inspeções diárias para detectar a formação do crescimento bacteriano. Dos 39 isolados bacterianos endofíticos testados, 15 reduziram concomitantemente galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz e apenas três não colonizaram as raízes do tomateiro, correspondendo a 80% a relação entre o controle e a colonização de raízes. Essa relação sobe para 85% quando se considera, separadamente, as medidas de eficácia de controle. As espécies que proporcionaram o melhor controle de *M. incognita* foram *Acinobacter johnsonii* (T 9 e T10), *Curtobacterium luteum* (P 16), *Bacillus pumillus* subg. B (T 27), *B. pumillus* (T 26) e *B. amyloliquefaciens* (T 36), as quais colonizaram, também, as raízes de tomateiro. *A. johnsonii* (T 10), *S. aureus* (P 18), *P. gordonae* (T 47), *B. pumillus* (T 51) e o isolado P 11 (espécie não identificada) reduziram, também, a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro segundo Silva (2004). O teste de colonização de raízes deve anteceder a seleção de bactérias candidatas ao antagonismo de fitonematóides.

Palavras – chave: controle biológico, nematóide das galhas, colonização de raízes.

Summary - Pinho, R. S. C., Campos, V. P., Silva, J. R. C., Oliveira, M. S., Pimentel, G. C. S., Costa, L. S. A. S., Souza, R. M. 2008. Effect of endophytic bacteria on the control of *Meloidogyne incognita* and their relationship with the root colonization of tomato.

Seeking for broadening the biocontrol spectrum of bacteria isolated from shoots of tomato and pepper and to study the relationship with the roots, this work aimed to evaluate the effect of those bacteria on the damage and reproduction of *Meloidogyne incognita* and the relationship of this antagonism with the tomato root colonization using the Phytigel[®] technique. Tomato seeds were embedded into bacterial suspension ($A_{540nm}=0,5$) for 24 hours. Then, the inoculated seeds were sown in 300 mL cups filled with Plantmax[®] substract. Fifteen days later, seedlings were inoculated with 400 eggs of *M. incognita* and placed in temperature controlled room at $\pm 27^{\circ}\text{C}$ and 12 h light. Thirty days later, the number of galls, egg-masses and eggs per gram of roots were evaluated. For the storage assay, the tomato seeds were embedded in bacterial suspension and, then, placed to germinate in sterile tubes with Phytigel[®] (0,8%) medium. The tubes were kept in growth chamber without light, at 28°C . The tubes were checked daily to find out bacterial growth. From 39 endophytic bacterial isolates tested, fifteen of them reduced, simultaneously, gall, egg-masses and eggs per gram of roots, but, only, three of them did not colonized tomato roots corresponding 80% the relationship between control and root colonization. This relationship increased to 85% when considered, separately, the three measurements of control efficacy. The species that gave better control of *M. incognita* were: *Acinobacter johnsonii* (T 9 e T10), *Curtobacterium luteum* (P 16), *Bacillus pumillus* subg. B (T 27), *B. pumillus* (T 26) e *B. amyloliquefaciens* (T 36) which colonized, also, the tomato roots. *A. johnsonii* (T 10), *S. aureus* (P 18), *P. gordonae* (T 47), *B. pumillus* (T 51) and isolate P 11 (unidentified species) reduced, also, the disease severity caused *Pseudomoas syringae* pv. *tomato* in tomato according to Silva (2004). The root colonization test should precede every bacterial screening for antagonism to plant parasitic nematodes.

Key words: biological control, root-knot nematodes, root colonization.

Introdução

A busca por bactérias antagonistas a fitonematóides tem se intensificado nas últimas décadas com maior ênfase para as endofíticas, já que tem capacidade de colonizar os tecidos internos do hospedeiro e promoverem o crescimento de plantas (PGPR) (Siddiqui et al. 2003). Bactérias com amplo espectro de antagonismo aos patógenos de plantas podem ter maior potencial de utilização na agricultura.

A relação alimentar da bactéria endofítica com a planta, sem causar doença, pode ocorrer pelo apoplasto e pelos exsudatos. Kloepper et al. (1992) demonstraram a multiplicação de bactérias endofíticas no apoplasto sem causar doença na planta. A partir de então aumentou o interesse dos pesquisadores na visualização da colonização do sistema radicular, buscando assim criar mais um critério para seleção de bactérias endofíticas antagonistas a patógenos do sistema radicular. Vários métodos têm sido empregados no estudo *in vitro* da colonização de raízes por bactérias como o uso de Phytigel[®] (Queiroz et al., 2006), ágar Noble (Habe et al., 2000) e ágar-ágar (Romeiro et al., 1999). Devido à sua simplicidade, esses métodos facilitam a seleção de um grande número de isolados rizobacterianos (Queiroz et al., 2006). Silva et al. (2003) constataram boa relação entre colonização de raízes e eficiência no controle de bactérias fitopatogênicas. Segundo Freitas (2003), para que uma rizobactéria seja eficiente em condições reais de cultivo, ela deve colonizar o sistema radicular da planta hospedeira e ser capaz de competir com bactérias nativas dos mais diversos solos.

Silva (2004) isolou bactérias de caules e hastes de tomateiro e pimentão e constatou que diversas espécies eram antagônicas a bacterioses do tomateiro. Visando ampliar o espectro de ação dessas bactérias e investigar sua relação com raízes, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito dessas bactérias

nos danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* e a relação desse antagonismo com a colonização de raízes de tomateiro pela técnica do Phytigel.

Material e Métodos

1- Efeito de isolados bacterianos endofíticos no número de galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz de tomateiro.

Para realização dos ensaios foram utilizados 39 isolados/espécies de bactérias endofíticas obtidas em trabalho anterior de Silva (2004), isoladas de caules e hastes de tomateiro e pimentão.

Preparo do inóculo bacteriano

Os isolados preservados em meio líquido peptona-glicerol em “freezer” a -80 °C, foram transferidos para as placas de Petri contendo meio “tryptic soy Agar” (TSA) e incubados a 28 °C em câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões bacterianas, adicionando-se às placas solução salina de NaCl a 8,5% e homogeneizando-as com uma alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada, em espectrofotômetro, para $A_{540nm}=0,5$.

Obtenção de ovos de *Meloidogyne incognita*

Os ovos de *Meloidogyne incognita* foram extraídos de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv Kada), mantidas em casa-de-vegetação, através da técnica proposta por Hussey & Barker (1973). As raízes de tomateiro foram lavadas e cortadas em pedaços de 1 cm de comprimento e, em seguida, trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras de 0,075 mm sobre 0,038 mm de abertura. O material retido na peneira de 0,038

mm foi coletado num Becker com uma pisseta, completando-se todo processo em 2 minutos.

Montagem e avaliação

Sementes de tomate da cultivar kada Santa Cruz foram esterilizadas superficialmente em etanol (50%) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos seguidas de três lavagens em água estéril. Essas sementes foram microbiolizadas em 5 mL de cada suspensão bacteriana por 24 horas e colocadas para germinar em copos, com volume de 300 mL, contendo substrato Plantmax[®]. Em seguida, os copos foram levados para sala climatizada com temperatura de ± 27 °C e fotoperíodo de 12h.

Quinze dias após a semeadura, 400 ovos de *M. incognita* em solução aquosa foram colocados em cada copo, através de dois orifícios de 2 cm de profundidade, feitos no substrato, próximos ao colo da plântula, com um bastão de vidro.

Trinta dias após a infestação do substrato com o nematóide foram avaliadas as seguintes variáveis: peso da matéria fresca do sistema radicular, número de galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz. Cada planta foi retirada cuidadosamente e cortada na altura do coleto para separação da parte aérea e raízes. Após separadas da parte aérea, as raízes foram cuidadosamente lavadas em água parada e secas com papel absorvente, sendo, em seguida, pesadas. A contagem de galhas foi feita visualmente em todo o sistema radicular. Para contagem de massas de ovos foi realizada a coloração em solução contendo corante artificial empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Todo sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5 cm de comprimento e os ovos extraídos pela técnica de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram quantificados em microscópio estereoscópico. Os números totais de

galhas, massas de ovos e ovos foram divididos pelo peso da matéria fresca do sistema radicular, calculando-se, então, o número de galhas, massas de ovos e ovos / grama de raiz.

Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos em delineamento blocos inteiramente casualizados, com três repetições. Os dados relativos a galhas e massas de ovos e ovos por grama de raiz foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. A análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5% de significância.

2- Colonização de raízes de tomateiros com bactérias endofíticas

Foram empregados os mesmos isolados bacterianos utilizados no ensaio anterior, bem como o mesmo preparo, concentração do inóculo e esterilização das sementes.

As sementes de tomateiro cultivar Kada Santa Cruz foram microbiolizadas em 5 mL de suspensão bacteriana por 24 horas, e colocadas para germinar em tubos de ensaio estéreis contendo Phytigel[®] (0,8%) (Queiroz et al., 2006). Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento sem luz, a 28°C. O ensaio foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Diariamente cada tubo era colocado sobre um fundo com luz fluorescente. Uma camada de aspecto leitoso contrastando com o meio Phytigel[®] ao longo do sistema radicular do tomateiro em formação caracterizou-se como crescimento bacteriano recebendo o sinal de (+). Quando não se

observou tal camada, considerou-se que o crescimento bacteriano não ocorreu e assim recebeu o sinal (-).

Resultados e Discussão

Dos 39 isolados bacterianos endofíticos, obtidos por Silva (2004), de caules e hastes de tomateiro e pimentão, 15 reduziram concomitantemente o número de galhas, massas de ovos e ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro. Com exceção do isolado T 28 de *Bacillus amyloliquefaciens*, que não reduziu o número de ovos por grama de raiz, as espécies *Acinobacter johnsonii* (3 isolados), *Curtobacterium luteum*, *Bacillus pumilus* subg. B., *B. pumilus* (2 isolados), *B. aureus*, P 11 (espécie não identificada), *Staphylococcus aureus*, *B. amyloliquefaciens* (4 isolados), *Paenibacillus gordonae* reduziram concomitantemente o número de galhas, massa de ovos e ovos por grama de raiz (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Efeito da microbiolização de sementes de tomateiro com bactérias endofíticas sobre o número de galhas, massas de ovos e ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro. Primeiro ensaio.

Espécie/Isolado	Galhas/g de raiz	Massas de ovos/g de raiz	Ovos/g de raiz	Colonização radicular**
Testemunha	80,00 b	62,67 b	19077,33b	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (T 9)	34,00 a	27,00 a	9823,67 a	+
<i>A. johnsonii</i> (T 10)	41,00 a	29,67 a	12488,00 a	+
<i>Bacillus cereus</i> (P13)	102,67 c	60,00 b	19962,67 b	+
<i>B. pumillus subg. B</i> (T 27)	47,67 a	36,00 a	11100,67 a	+
<i>B. pumillus</i> (T 39)	176,67 d	106,33 c	42347,67 c	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 41)	72,33 b	54,67 b	16200,67 b	-
<i>B. sphaericus</i> (T 42)	76,33 b	35,67 a	15148,67 b	+
<i>B. sphaericus</i> (T 43)	69,33 b	31,67 a	9762,33 a	+
<i>B. marinus</i> (T 44)	132,67 d	61,33 b	18764,33 b	+
<i>B. sphaericus</i> (T45)	58,33 b	41,67 a	17218,33 b	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 50)	150,67 d	85,00 c	22540,00 b	+
<i>B. sphaericus</i> (T 54)	82,33 b	74,33 c	24261,67 b	+
<i>Curtobacterium luteum</i> (P 16)	48,67 a	27,67 a	11073,67 a	+
T 30*	79,33 b	43,67 a	14397,00 a	+
T 35*	65,00 b	42,00 a	18220,67 b	-
<i>Paenibacillus gordonae</i> (T 37)	158,00 c	120,33 c	23628,00 b	+
<i>P. gordonae</i> (T 40)	86,00 b	52,00 b	17242,67 b	-
T 38*	80,67 b	41,67 a	18769,33 b	-
CV (%)	11,93	14,36	15,38	-

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Os dados sobre de galhas, massa de ovos e ovos/ g de raiz foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$. * Espécie não identificada. ** (+) colonizado; (-) não colonizado.

Tabela 2. Efeito da microbiolização de sementes de tomateiro com bactérias endofíticas sobre o número de galhas, massas de ovos e ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro. Segundo ensaio.

Espécie/Isolado	Galha/g de raiz	Massas de ovos /g de raiz	Ovos/g de raiz	Colonização radicular**
Testemunha	131,33 b	82,33 c	13547,00 b	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (T 1)	96,67 a	54,67 b	6141,33 a	+
T 2*	267,67 c	77,33 c	21990,00 c	+
T 4*	126,33 b	66,67 c	21076,67 c	+
P 11*	113,00 a	44,33 b	8514,67 a	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (P 18)	114,00 a	58,00 b	7516,00 a	+
<i>Bacillus cereus</i> (T 6)	100,00 a	49,67 b	6500,33a	+
<i>B. subtilis</i> (P 19)	148,67 b	88,67 c	9984,33 a	+
<i>B. pumillus</i> (P 20)	136,33 b	80,67 c	16428,67 b	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 21)	89,00 a	46,00 b	7761,00 a	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 22)	84,67 a	54,33 b	8933,33 a	+
<i>B. pumillus</i> (T 26)	68,67 a	24,00 a	6704,67 a	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 28)	90,00 a	33,67 a	14261,00 b	-
<i>B. subtilis</i> (T 31)	210,67 c	89,33 c	16492,67 b	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> (T 36)	78,00 a	33,00 a	8200,33 a	+
<i>B. pumillus</i> (T 48)	168,67 c	68,33 c	13003,33 b	-
<i>B. pumillus</i> (T 49)	89,67 a	59,33 b	9959,67 a	+
<i>B. pumillus</i> (T 51)	73,67 a	45,00 b	8738,67 a	+
<i>B. pumillus</i> (T 52)	151,67 b	77,33 c	13657,33 b	-
<i>B. sphaericus</i> (P 53)	162,33 c	89,33 c	31606,67 d	+
<i>Microbacterium liquefaciens</i> (T 34)	126,00 b	67,33 c	11166,67 a	+
<i>P. macerans</i> (T 47)	84,67 a	53,67 b	9878,33 a	+
CV (%)	9,47	11,11	15,85	-

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Os dados sobre de galhas, massa de ovos e ovos/ g de raiz foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$. * Espécie não identificada. ** (+) colonizado; (-) não colonizado.

Os isolados T 30 e T 35 (espécies não identificadas) e *Bacillus sphaericus* (T 42, 43 e 45) reduziram massas de ovos sem reduzir o número de galhas (Tabela 1). Já os isolados T 30, *B. sphaericus* (T 43), *B. subtilis* (P 19) e *Microbacterium liquefaciens* (T 34) reduziram ovos, mas não galhas por grama de raiz.

As reduções variaram de 13,96% a 57,5% para número de galhas por grama de raiz, 27,94% a 70,85% para número de massas por grama de raiz e de 15,08% a 54,67% para número de ovos por grama de raiz.

Com exceção das espécies *Curtobacterium luteum* (P 16) e *Staphylococcus aureus* (P 18) e o isolado P 11 isolados do pimentão, todas os demais que reduziram concomitantemente galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz foram isolados do tomateiro (Tabelas 1 e 2).

Dos 39 isolados e espécies bacterianos endofíticos testados 66,7% colonizaram as raízes de tomateiro. Das espécies que colonizaram raízes de tomateiro 69,2% reduziram galhas, massas de ovos ou ovos por grama de raiz. Quinze isolados reduziram concomitantemente galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz, apenas três deles não colonizaram as raízes de tomateiro P 11 (espécie não identificada) e *B. amyloliquefaciens* (T21 e 28), correspondendo a 80% a relação entre controle e a colonização de raízes. Essa relação sobe para 85% quando se considera, separadamente, as três medidas de eficácia de controle. Os isolados T 2, T 4, *B. sphaericus* (P 53), *B. cereus* (P 13), *Paenibacillus gordonae* (T 37), *B. marinus* (T 44), *B. amyloliquefaciens* (T 50) e *B. sphaericus* (T 54) colonizaram as raízes mas não causaram redução de galhas, massas de ovos ou ovos por grama de raiz, correspondendo 30,8% das bactérias colonizadoras de raiz. Das bactérias isoladas do pimentão, apenas *B. pumillus* (P 20) não colonizou as raízes de tomateiro, mas não causou também redução de galhas, massas de ovos ou ovos por grama de raiz. As demais colonizadoras de raízes de tomateiro e isoladas de pimentão, três delas causaram redução de

galhas, massas de ovos e/ou ovos por grama de raízes e duas delas nada causaram (Tabelas 1 e 2).

As espécies que proporcionaram o melhor controle de *M. incognita* foram *Acinobacter johnsonii* (T 9 e 10), *Curtobacterium luteum* (P 16), *B. pumillus* subg. B (T 27), *B. pumillus* (T 26) e *B. amyloliquefaciens* (T 36), as quais colonizaram, também, as raízes de tomateiro (Tabelas 1 e 2).

As espécies e isolados aqui estudados, os quais foram isolados de caules e hastes de tomateiro e pimentão por Silva (2004), afetam também patógenos da rizosfera. Naves (2000), trabalhando com isolados da rizosfera, encontrou a maioria das espécies aqui relatadas, comprovando que estas bactérias procedem da rizosfera e se multiplicam no apoplasto da planta como demonstrado por Kloepper et al. (1992). Naves (2000) constatou, também, reduções de 18,79% a 58,68% para número de galhas por grama de raiz e de 20,75% a 64,87% para número de ovos por grama de raiz, em plantas de tomateiro infestadas com *M. javanica*, tratadas com bactérias endofíticas. Halmann et al. (1995) também verificaram uma redução em até 50 % da infecção causada por *M. incognita* em plantas de pepino.

Dentre os isolados mais promissores no controle de *M. incognita*, 53,3% das espécies aqui estudadas foram do gênero *Bacillus* (Tabelas 1 e 2). Naves (2000), trabalhando com bactérias endofíticas isoladas de raízes de diversas plantas, selecionou sete isolados, todos *Bacillus*, que proporcionaram as maiores reduções no número de galhas e de ovos de *M. javanica* em tomateiro. Sikora (1988) relatou reduções na infecção de *M. arenaria*, *M. incognita* em torno de 60 a 65% com o tratamento de sementes de várias culturas com *Bacillus subtilis*. Em alguns estudos com bactérias do gênero *Bacillus* foram obtidos resultados tão bons que os autores decidiram patentear uma combinação de *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus*, denominada NOVO-BIOTECH – 7996, para o controle de fitonematóides (Bchir & Bchir, 2000). O uso de *Bacillus*

firmus foi também patentado para o controle de fitonematóides, especialmente os do gênero *Meloidogyne* (Feldman et al., 1999).

A alta ocorrência de bactérias colonizadoras da rizosfera (66,7%) dentre as bactérias endofíticas testadas pela técnica do Phytigel[®], alta relação entre eficácia de controle de *M. incognita* e colonização de raízes (85%) e a inclusão do grupo mais eficaz no controle de *M. incognita* como colonizadora de raiz (80%), sustentam a recomendação do teste de colonização de raízes como primeira seleção antes de se testar o antagonismo ao fitonematóide, reduzindo o número de isolados e economizando tempo e esforços nos testes futuros *in vitro* e em casa-de-vegetação.

Alta relação entre colonização de raízes por bactérias endofíticas e eficácia no antagonismo a fitopatógenos também têm sido encontradas em outros patossistemas. Silva et al. (2003) verificaram uma relação de 100% entre colonização de raízes e eficiência de controle de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro, utilizando rizobactérias e indicaram esse teste para seleção massal de rizobactérias.

Apesar de não se poder afirmar que um isolado que tem a capacidade de colonizar raízes *in vitro* o faça também em campo, trabalhos mostram que bactérias que colonizam o sistema radicular apresentam um bom controle de espécies de *Meloidogyne*. Halmann et al. (1998), trabalhando com bactérias endofíticas de algodão, observaram redução significativa do número de galhas de algodoeiro causadas por *M. incognita* e uma correlação com o estabelecimento dessas bactérias dentro das raízes. Em trabalhos utilizando *Pseudomonas aeruginosa* isolado IE-6 e um mutante resistente à estreptomicina IE-6⁺ capazes de colonizar os tecidos internos de raízes de tomateiro, foi observada redução da população de *M. javanica* sob condições de campo e casa-de-vegetação (Siddiqui et al., 2000; Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2001).

Embora, neste estudo, grande relação ocorresse entre as bactérias colonizadoras de raízes de tomateiro e o antagonismo a *M. incognita*, espécies não colonizadoras também manifestaram antagonismo a esse nematóide, podendo separá-las em quatro grupos: a) redutoras de infectividade e reprodução de *M. incognita* e colonizadoras de raízes de tomateiro; b) redutoras de infectividade e reprodução e não colonizadoras de raízes; c) não redutora de infectividade e reprodução mas colonizadoras de raízes e d) não redutora de infectividade e reprodução e não colonizadoras de raízes. A relação diversificada da bactéria endofítica com a rizosfera e antagonismo a *M. incognita* aqui constatado, sugere diferentes modos de atuação dessas bactérias com relação ao antagonismo a *M. incognita*.

Ao que tudo indica a colonização de raízes por bactérias endofíticas está ligada à habilidade na utilização de exsudatos excretados pela planta. Segundo Kloepper et al. (1985), os isolados de rizobactérias com maior habilidade na utilização de exsudatos de sementes possuem vantagem seletiva na colonização de raízes, pois durante o processo de germinação de sementes ocorre liberação de carboidratos e aminoácidos em abundância na forma de exsudatos (Subrahmanyam et al., 1983). Um outro modo de ação dessas rizobactérias envolve a transformação do exsudato radicular em subproduto do seu metabolismo, impedindo que o nematóide reconheça o estímulo quimiotrópico, levando-o a perder suas reservas energéticas e a infectividade (Bergerson, 1959; Christophers et al., 1997). Além disso, o processo de reconhecimento da planta pelo nematóide é controlado por interações entre lectinas na superfície da raiz e os carboidratos na cutícula do nematóide (Zuckerman, 1983) e, acredita-se, que as rizobactérias se ligam às lectinas na superfície das raízes, interferindo nesse processo de reconhecimento da planta hospedeira pelo fitonematóide (Stirling, 1991). Tudo isso pode explicar a atuação do grande grupo antagonista a *M. incognita* e colonizadora de raízes

relativas aos dados obtidos nos ensaios aqui relatados. Segundo Freitas (2005) essas bactérias teriam maior eficiência nas condições de campo por colonizarem o sistema radicular. Contudo, um grupo menor de bactérias não colonizadoras, porém antagonista, deve envolver outros sistemas, como resistência induzida. Também substâncias com atividade nematicida e / ou nematostática podem ter sido produzidas por essas bactérias ou mesmo a liberação de aminoácidos do seu metabolismo que seja tóxico a *M. incognita*.

Por outro lado, um grupo pequeno de bactérias colonizadoras das raízes de tomateiro, mas não antagonista a *M. incognita*, pode ter produzido substâncias atrativas a ele durante o processo de colonização de raízes. Já as bactérias não colonizadoras de raízes de tomateiro e não antagonista a *M. incognita* são de baixa competência rizosférica, uma vez que pesquisas têm demonstrado que a densidade de bactérias que colonizam a rizosfera é independente da densidade do inóculo inicial aplicado à semente, mas dependente da fonte de substrato proveniente das raízes (Bennett & Lynch, 1981; Scher et al., 1984; Kloepper et al., 1985; Juhnke et al., 1989).

Os estudos aqui feitos com *M. incognita* ampliaram o espectro de ação antagonista de muitas bactérias do caule e haste de tomateiro e pimentão. As espécies *A. johnsonii*, *S. aureus*, *P. gordonae*, *B. pumillus* e o isolado P 11 que reduziram, neste estudo, a reprodução de *M. incognita*, também reduziram a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro segundo dados de Silva (2004).

Conclui-se, portanto, que: a) 66,7% das bactérias endofíticas testadas colonizaram raízes de tomateiro; b) 85% das bactérias endofíticas que reduziram os danos e/ou reprodução de *M. incognita* colonizaram raízes de tomateiro; c) as espécies que proporcionaram o melhor controle de *M. incognita* foram *Acinobacter johnsonii* (T 9 e T10), *Curtobacterium luteum* (P 16), *Bacillus pumillus* subg. B (T 27), *B. pumillus* (T 26) e *B. amyloliquefaciens* (T 36); d) as

bactérias *A. johnsonii*, *S. aureus*, *P. gordonae*, *B. pumillus* e o isolado P 11 (espécie não identificada) reduziram danos e/ou reprodução de *M. incognita* e também reduziram a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro segundo Silva (2004); e) o teste de colonização de raízes deve anteceder a seleção de bactérias candidatas a antagonismo de fitonematóides.

Literatura Citada

BCHIR, M. M.; BCHIR, M. M. Live bacterial composition for biological control of nematodes – comprising *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains, having synergistic activity. **Patente n. JP2000511204-W**, 29 ago. 2000.

BENNETT, R. A.; LYNCH, J. M. Colonization potential of bacteria in the rhizosphere. **Current Microbiology**, new York, v. 6, n. 3, p.137-138, 1981.

BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, n. 3, p. 344-354, 1959.

CHRISTOPHERS, A. E. P.; PATEL, M. N.; BENSON, J. A.; SAKA, V. W.; EVANS, A. A.; WRIGHT, D. J. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120, jan. 1997.

FELDMAN, K.; PELEG, I.; HANDELMAN, J. H. New bacterial strains of species *Bacillus firmus* – have nematicidal activity, used for controlling plant pathogenic nematodes, particularly nematodes causing root-knot disease. **Patente n. BR9608204-A**, 07 dez. 1999.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. Viçosa, MG: UFV, 2003. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2006.

HABE, M. H.; UESUGI, C. H. Métodos *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 657-660, jul./ago. 2000.

HALMMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRIGUEZ-KABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 925-937, Jul. 1998.

HALLMANN, J., KLOEPPER, J., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SIKORA, R.A. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 10, p. 11-36, Oct. 1995.

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.

JUHNKE, M. E.; MATHRE, D.E.; SANDS, D. C. Relationship between bacterial seed inoculum density and rhizosphere colonization of spring wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 591-595, Apr. 1989.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 75-84, Jan. 1992.

KLOEPPER, J. W.; SCHER, F. M.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, n.10, p. 926-929, Oct. 1985.

QUEIROZ, B. P. V.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MELO, I. S. Visualização *in vitro* da colonização de por rizobactérias. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 95-97, jan/mar. 2006.

NAVES, R. L. **Bactéria endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides**. 2000. 113 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROCHA, F. S.; MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 293-297, dez. 2005.

ROMEIRO, R. S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H.; MOURA, A. B.; SILVA, H. S. A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e sua implicação na indução de resistência sistêmica e enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 255, Ago. 1999.

SCHER, F. M.; ZIEGLE, J. S.; KLOEPPER, J. W. A method for assessing the root colonizing capacity of bacteria on maize. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 30, n. 2, p. 151-157, 1984.

- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, Sept. 1974.
- SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Endophytic bacteria: prospects and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Nematologia Mediterrânea**, Pisa, v. 31, n. 3, p. 111-120, June 2003.
- SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Suppression of the root rot-knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: influence of inoculum density, nematode population, moisture and other plant-associated bacteria. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 237, n. 1, p. 81-89, Nov. 2001.
- SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot-knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterrânea**, Pisa, v. 28, n. 2, p. 189-192, Dec. 2000.
- SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit**. Gent, v. 53, n. 2b, p. 867-878, 1988.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 1, p. 42-46, Jan. 2003.
- SILVA, J. R. C. **Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*) bacterianas do tomateiro**. 2004. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**: Progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International, 1991. 282 p.
- SUBRAHMANYAN, P., REDDY, M. N.; RAO, A. S. Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. **Seed Science and Technology, Zürich**, v. 11, n.2, p. 267-272, 1983.
- ZUCKERMAN, B. M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 15, n. 2, p. 173-183, Apr. 1983.