



RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

**EFEITO DE METABÓLITOS BACTERIANOS
EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE *Meloidogyne*
*incognita***

LAVRAS – MG

2011

RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

**EFEITO DE METABÓLITOS BACTERIANOS EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE *Meloidogyne incognita***

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS – MG

2010

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

Pinho, Renata Silva Canuto de.

Efeito de metabólitos bacterianos em diferentes estádios de
Meloidogyne incognita / Renata Silva Canuto de Pinho. – Lavras :
UFLA, 2010.

74 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Nematoides. 2. Bactérias endofíticas. 3. Compostos orgânicos voláteis. 4. Nematicida. 5. Fitonematoides. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.2

RENATA SILVA CANUTO DE PINHO

**EFEITO DE METABÓLITOS BACTERIANOS EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 16 de dezembro de 2010.

Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Denilson Ferreira de Oliveira	UFLA
Dra. Rosemeire de Lellis Naves	EMBRAPA

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2010**

DEDICO

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

OFEREÇO

À minha família, pela força e incentivo.

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 da bolsa de estudo.

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

Aos professores Ricardo Magela de Souza e Denilson Ferreira de Oliveira pela co-orientação e sugestões na confecção da tese.

À professora Antônia dos Reis Figueira e a pesquisadora Rosemeire de Lellis Naves pelas sugestões na confecção da tese.

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

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

À estagiária e amiga Márcia, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia: Eduardo, Cleber, Alex, Lílian, Maria Clara, Willian, Davi, Marina e Luma.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais: Alan, Viviane e Willian.

OBRIGADA

RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) de 36 bactérias endofíticas foram testados no antagonismo ao nematoide *Meloidogyne incognita*. A maioria deles (94,4%) causou imobilidade muito forte de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* enquanto apenas 30,6% e 38,9% causaram mortalidade muito forte e forte, respectivamente. Entre os isolados que, simultaneamente, causavam imobilidade e mortalidade muito fortes estão: *Bacillus pumilus* (quatro isolados), *B. sphaericus* (três isolados), *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans* e P 11 (espécie não-identificada). A exposição de J2 de *M. incognita* aos COVs, produzidos pelo *B. sphaericus* (is. 43) e *B. pumilus* (is. 51 e 52) reduziu bastante a eclosão, a infectividade de J2 em tomateiro e a energia corporal (lipídios). Foram identificadas, por cromatografia gasosa, 12, 4 e 3 moléculas a partir do is. 43 (*B. sphaericus*) is. 51 e 52 (*B. pumilus*), respectivamente. Algumas moléculas encontradas nos COVs bacterianos, isto é, dodecanona, 2,4-di-terc-butilfenol (BHT), 2-etil-1-hexanol, 4-metilnonano causaram baixa ou nenhuma mortalidade de J2 de *M. incognita*, quando os produtos comerciais equivalentes foram testados. Entretanto, o linalool, produzido por *B. sphaericus* (is. 43), apresentou alta mortalidade de J2 quando foi testado o produto comercial. Em outro trabalho, foram realizados testes de mobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* com filtrados de 71 isolados rizobacterianos e de bactérias endofíticas, liofilizados ou não e liofilizados com a extração de aminoácidos com diclorometano. A atividade nematocida dos filtrados bacterianos foi reduzida com a liofilização e foi, ainda, maior quando o processo de liofilização foi seguido pelo tratamento com diclorometano. Portanto, os aminoácidos foram os ingredientes ativos, dos filtrados bacterianos, no antagonismo a *M. incognita*.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*. Bactéria endofítica. Rizobactéria. Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) from 36 endophytic bacteria were tested for antagonism to the nematode *Meloidogyne incognita*. Most of the isolates (94.4%) caused very strong immobility of *M. incognita* J2 whereas only 30.6% and 38.9% caused very strong and strong mortalities, respectively. Among the isolates that simultaneously caused very strong immobility and mortality were: *Bacillus pumilus* (four isolates), *B. sphaericus* (three isolates), *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans* and P 11 (non-identified species). The exposure of *M. incognita* J2 to VOCs produced by *B. sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) VOCs highly decreased egg-hatching, infectivity on tomato and body lipid energy. By gas chromatography analysis, 12, 4 and 3 molecules were identified from is. 43 (*B. sphaericus*) is. 51 and 52 (*B. pumilus*), respectively. Some molecules found in bacterium VOCs i.e. dodecanone, 2,4-di-tert-butylphenol (BHT), 2-ethyl-1-hexanol, 4-methylnonane caused low *M. incognita* J2 mortality or none when the commercial products were tested. On the other hand, linalool produced by *B. sphaericus* (is. 43) showed high J2 mortality when the commercial product was tested. In another work, seventy one isolates of rhizobacterium and endophytic bacterium supernatants were lyophilized or not and lyophilized followed by amino acid extraction by dichloromethane and then tested for *M. incognita* J2 immobility and mortality. The nematicidal activity of the non-treated bacterium culture filtrates was reduced by lyophilization and even more so when the lyophilization was followed by dichloromethane treatment. Thus, the amino acids were the active ingredient of the bacterium cultures antagonistic to *M. incognita*.

Keywords: *Meloidogyne incognita*. Endophytic bacteria. Rhizobacteria. Volatile organic compounds.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Nematoides de galhas	11
2.2	Bactérias endofíticas	12
2.3	Bactérias endofíticas no controle de fitonematoides	13
2.4	Mecanismo de ação	15
2.5	Efeito dos filtrados de culturas bacterianas sobre fitonematoides	15
2.6	Efeito de substâncias orgânicas voláteis produzidas por bactérias no controle de fitonematoides	17
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
	ARTIGO 1 Activity of volatile organic compounds from endophytic bacteria on the nematode <i>Meloidogyne incognita</i>	26
	ARTIGO 2 Efeito de filtrados rizobacterianos e endofíticos liofilizados e sem aminoácidos na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	56

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides acarretam perdas na produção de importantes culturas agrícolas. Atualmente, existem cerca de 15 mil espécies descritas no mundo, e, no país, o número de nematoides que parasitam plantas chega a 238 espécies (IONOMOTO, 1995). Aparentemente, o gênero *Meloidogyne* são os que acarretam, em geral, os problemas mais sérios, que pode ser decorrente da grande capacidade de adaptação de tais fitoparasitas a diversos agroecossistemas (ZACHEO, 1993).

A retirada do brometo de metila - produto volátil- do mercado deixou os produtores rurais e os pesquisadores sem opção para a esterilização de solo e de materiais para a pesquisa. Várias alternativas têm sido pesquisadas, como a biofumigação, através de resíduos de plantas produtoras de glucosinolatos que são transformados em isotiacianatos tóxicos a fitonematoides, e a possível descoberta de moléculas sucedâneas a partir de voláteis tóxicos a fitonematoides produzidos por micro-organismos. Nos últimos anos tem-se encontrado grande diversidade de produção de voláteis pela microflora (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

A busca dessas moléculas voláteis em bactérias endofíticas, além da sua caracterização estrutural, abre a possibilidade de se encontrarem, no mercado, análogos comerciais com potencial para serem empregados como nematicidas. Desta forma, a sua produção em larga escala já teria o domínio industrial, restando apenas definir mistura de moléculas para potencializar sua atividade nematicida, além da definição sobre detalhes da aplicabilidade no campo, viveiros e casa de vegetação, chegando à aplicação prática e econômica na busca

de um sucedâneo para o brometo de metila. A pesquisa para se chegar a esse nematicida terá grande relevância social e econômica para o meio rural.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematoides de galhas

Setenta por cento dos danos causados por fitonematoides são atribuídos aos nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) (SASSER; FRECKMAN, 1987). Esses nematoides foram relatados pela primeira vez em 1855, por Berkeley, que observou os danos causados por esses fitoparasitas em pepino. Porém, antes de 1949, todos os nematoides, cujas fêmeas tinham aspecto periforme, tanto os de corpo mole como duro, estavam numa única espécie *Heterodera marioni*. Em 1949, Chitwood estudou este grupo de fitonematoides e os separou em corpo mole denominando-os de *Meloidogyne* e descreveu sete espécies, restabelecendo o gênero *Meloidogyne* de Goeldi (1887), publicado em 1892 (KARSSSEN, 2002; SIDDIQI, 2000).

A fase infectiva eclode do ovo e é denominada juvenil de segundo estágio (J2). O J2 tem energia armazenada suficiente para localizar e penetrar na raiz e estabelecer o sítio de alimentação, geralmente dentro do periciclo/endoderme. As secreções esofagianas são injetadas nesses tecidos, incitando a produção de células gigantes multinucleadas, que constitui fonte contínua de alimento para o nematoide. Ao se alimentar o J2 se mostra mais robusto, com o corpo salsichoide e perde a mobilidade tornando-se sedentário. Porém, passa ainda por mais três ecdises até chegar ao estágio adulto, sendo que os juvenis de terceiro e quarto estágios não possuem estilete e, portanto, não se alimentam. O estilete reaparece após a quarta ecdise e as fêmeas adultas voltam a se alimentarem. No estágio adulto, após três dias, inicia-se a ovoposição. Os ovos são impregnados por um material gelatinoso secretado pela glândula retal e excretado pelo ânus, localizado ao lado da vulva na extremidade posterior. O

ciclo é completado em 28 dias em condições ótimas de temperatura e umidade (CAMPOS, 2000; SIDDIQI, 2000).

Meloidogyne spp. Provoca nas plantas diversos sintomas como a presença de galhas nas raízes, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes, clorose e menor crescimento da parte aérea, culminando com a redução da produção (TIHOHOD, 1993).

Embora os nematoides sejam importantes patógenos primários, podem, também, interagir com outras doenças, pela predisposição das plantas à infecção por fungos ou bactérias, uma vez que os ferimentos causados, durante a alimentação, propiciam o acesso dos organismos a tecidos radiculares intercalares. Frequentemente, os danos dos nematoides às plantas resultantes da habilidade parasítica do nematoide em interação com fitopatógenos, produzem doenças do tipo “complexo” (MICHEREFF et al., 2005).

Os nematoides de galhas são de difícil controle e fácil disseminação. Possuem ampla gama de hospedeiros, atacando a maior parte das culturas de importância econômica (LORDELLO, 1984).

2.2 Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas de um tecido de planta desinfestado superficialmente ou extraída de dentro da planta. Esta definição inclui bactérias que colonizam os tecidos internos com aparente efeito neutro, bem como as simbiontes. Além disso, inclui as bactérias que, durante sua fase endofítica, flutuam entre a colonização endofítica e epifítica (HALMANN et al., 1997).

As bactérias endofíticas têm sido isoladas da maioria das plantas cultivadas e, provavelmente, isto se aplica também às plantas silvestres. A

maioria das pesquisas, contudo, é voltada para plantas cultivadas (ROMEIRO, 2005). Bactérias isoladas de tecidos internos de plantas sadias compreendem mais de 129 espécies, representando mais de 54 gêneros (HALLMAN et al., 1997; MAHAFFEE; KLOPPER, 1997), dos quais *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* são as mais comuns.

As bactérias endofíticas provavelmente desenvolveram íntima relação com sua planta hospedeira através de processos coevolucionários e podem influenciar a fisiologia da planta de alguma forma ainda não elucidada (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990).

Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN; BENHAMOU; KLOPPER, 1997). Estas bactérias entram na planta, primeiramente através da raiz. Entretanto, a parte aérea das plantas, como flores, caules e cotilédones podem também ser portas de entrada. Dentro da planta essas bactérias podem se localizar no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al. 1997; ZINNIEL et al., 2002).

A forma mais adequada de se introduzir uma bactéria endofítica em plantas, seja para fins agrônômicos de promoção de crescimento, de controle biológico ou de alterações genéticas dessa planta, é imitando, na medida do possível, o modo de penetração natural. Portanto, a forma mais comum para se introduzir uma endofítica parece ser por ferimentos que sirvam de porta de entrada (ROMEIRO, 2005).

2.3 Bactérias endofíticas no controle de fitonematoides

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de bactérias endofíticas no controle de fitonematoides, principalmente, para o gênero *Meloidogyne*.

Halmann et al. (1995) testaram, em casa de vegetação, 72 isolados obtidos de plantas de pepino e algodão no controle de *Meloidogyne incognita*. Os resultados demonstraram que o uso das bactérias *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. vesicularis*, *Serratia mercenscens* e *Sphingomonas paucimobilis* reduziram em até 50 % a infecção pelo nematoide em plantas de pepino.

Pseudomonas aeruginosa isolado IE-6 e um mutante resistente à estreptomicina IE-6⁺ foram capazes de colonizar os tecidos internos das raízes de tomateiro, e reduzir, significativamente, a população de *Meloidogyne javanica* sob condições de campo e casa de vegetação (SIDDIQUI; EHTESHAMUL-HAQUE, 2000a, 2000b).

Munif, Hallmann e Sikora (2001), realizando estudos com as bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans*, *Cedeca davisae*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas putida* observaram que houve redução na penetração de J2 e no número de galhas de *Meloidogyne incognita* em tomateiro, em casa de vegetação.

Raízes de arroz tratadas com *Bacillus megaterium* resultaram na redução de 40% da penetração de J2 de *Meloidogyne. graminicola* e formação de galhas, quando comparada com o tratamento em que as raízes não foram tratadas. Além disso, houve uma redução da migração de *M. graminicola* em direção às raízes colonizadas por *B. megaterium* (PADHAM; SIKORA, 2007). Pinho et al. (2009) também verificaram alta a correlação entre colonização de raízes por bactérias endofíticas em teste *in vitro* com a eficiência de controle de *M. incognita* em sementes de tomateiro microbiolizadas em experimentos em casa de vegetação.

Considerando-se que a maioria das pesquisas, na interação de bactérias endofíticas com nematoides, tem sido conduzida com o nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.), a associação de outras espécies de nematoides com bactérias endofíticas é também de grande interesse. Por exemplo, Aravind et al.

(2010) testaram bactérias endofíticas, isoladas de pimenta do reino (*Piper nigrum L.*), contra o nematoide migrador *Radopholus similis* que causa sérios prejuízos a essa cultura. Os isolados de *Bacillus megaterium* e *Curtobacterium luteum* reduziram, significativamente, a população de *R. similis* nas três cultivares de pimenta do reino testadas.

2.4 Mecanismo de ação

Pouco se sabe sobre os mecanismos de antagonismo envolvidos na ação das bactérias endofíticas. Encontram-se na literatura, porém, algumas sugestões de mecanismos, como antagonismo direto e/ou por meio de metabólitos ou por indução de resistência (SIDDQUI; SHAUKAT, 2003). Hallmann et al. (2001) dividiram as bactérias endofíticas em dois grupos: (1) isolados que colonizam extensivamente o tecido interno de plantas e reduzem a população de nematoides por ocupação de nichos, antibiose ou ambos, e (2) isolados que colonizam primeiramente o córtex de raízes onde eles geralmente estimulam os mecanismos de defesa/resistência da planta.

Alguns trabalhos mostram que as bactérias endofíticas são capazes de atingir múltiplos pontos de vulnerabilidade no ciclo de vida dos nematoides como inibição da penetração, reduzindo a capacidade reprodutiva e retardando a mobilidade e eclosão (PADGHAM; SIKORA, 2007).

2.5 Efeito dos filtrados de culturas bacterianas sobre fitonematoides

Estudos têm demonstrado o efeito nematicida e nematostático de filtrados de culturas bacterianas. Carneiro, Souza e Belarmino (1998) testaram 21 isolados de *Bacillus* spp. em J2 de *Meloidogyne javanica*, em ensaios *in vitro*. A cultura total e o sobrenadante de *B. thuringiensis brasiliensis* e *B.*

lateosporus mataram J2 recém eclodidos após 24 e 48 horas. Contudo, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis morrisoni* e *B. circulans* causaram apenas imobilização ou redução de movimento. Embora a natureza química dos sobrenadantes não tenha sido determinada, os resultados sugerem a presença de mais de uma toxina com alto poder nematicida.

Naves, Campos e Souza (2004) trabalharam com filtrados de culturas de 40 isolados de bactérias endofíticas, obtidos a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas. Dos filtrados testados, sete imobilizaram J2 de *Meloidogyne javanica* em 24 horas, não ocorrendo recuperação da mobilidade após serem transferidos para água. Os filtrados de dois isolados provocaram a morte de mais de 90% dos J2 após 48 h de exposição. Diferentes diluições dos filtrados dos oito isolados mais eficientes também foram testadas. Maiores índices de mortalidade foram provocados pelos filtrados não diluídos seguidos pelas diluições em água 1:1 e 1:2 (v/v).

Além de apresentarem efeito em J2 de *Meloidogyne* spp. os filtrados bacterianos endofíticos têm efeito também na eclosão desse nematoide. Redução de 60% na eclosão de *M. graminicola* foi observada com o uso de filtrados de *B. megaterium* em relação aos ovos que não foram expostos ao filtrado (PADHAM; SIKORA, 2007). Naves, Campos e Souza (2004) verificaram que os mesmos filtrados dos isolados que apresentaram alta mortalidade de J2 de *M. javanica* também inibiram eficientemente a eclosão dos J2.

Comprovada a eficiência de alguns filtrados bacterianos, alguns trabalhos tentam elucidar quais são as possíveis substâncias que têm um efeito nematicida ou nematostático. Siddiqui e Ehteshamul-Haque (2000b) encontraram substâncias polares como princípio ativo de *Pseudomonas aeruginosa*. Ali et al. (2002), trabalhando com isolados de *Pseudomonas* spp. verificaram que os metabólitos responsáveis pela atividade nematicida foram glicoproteínas e proteínas.

Em trabalho recente realizado pelos laboratórios de Produtos Naturais e Nematologia da Universidade Federal de Lavras, alguns aminoácidos apresentaram atividade nematicida contra *M. exigua*. Este trabalho foi iniciado a partir da purificação de substâncias ativas contra *M. exigua* produzidas pela bactéria *Paenibacillus macerans*. Foi verificado que substâncias nematicidas produzidas por essa bactéria eram os aminoácidos treonina, glicina, alanina, valina, histidina, metionina, isoleucina e leucina. Esses aminoácidos foram testados contra J2 de *M. exigua*, o que permitiu confirmar suas atividades nematicidas (OLIVEIRA et al., 2009). Barbosa et al. (1999) verificaram a atividade de L-3,4-diidroxifenilalanina contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. Osman (1993) observou a atividade de L-arginina e de ácido L-glutâmico contra *Meloidogyne javanica*. Talavera e Mizukubo (2005) verificaram a atividade de DL-metionina contra *M. incognita*.

2.6 Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos por bactérias no controle de fitonematoides

Bactérias antagonistas podem produzir compostos voláteis capazes de inibir o crescimento e, ou, a multiplicação de outros micro-organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003). Entre esses compostos citam-se álcoois, aldeídos, cetonas, sulfetos e amônia (DUFFY; SCHOUTEN; RAAIJMAKERS, 2003).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são substâncias com aproximadamente, 20 átomos de carbono, de baixa polaridade. Eles podem atravessar as membranas livremente e são liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Também são difundidos rapidamente pelo movimento de solução aquosa e pelo fluxo em massa de água pelo perfil do solo (WHEATLEY, 2002). São de

fácil penetração pela membrana e distribuição eficiente pela porosidade do solo, o que aumenta a área de influência dos COVs e melhoram sua eficácia na morte de micro-organismos sob o ponto de vista de controle. Assim, os COVs podem atuar no solo e acima do mesmo (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

Embora os COVs sejam comuns no ecossistema, os produzidos por micro-organismos, contudo, receberam maior atenção apenas nos últimos anos. A emissão de COVs por bactérias e fungos é específica de cada espécie e servem como informantes químicos para a comunicação intra e interespecífica, célula-a-célula, além de possível válvula para escape de carbono e agentes promotores ou inibidores de crescimento (KAI et al., 2009), podendo essa última função ser importante na criação de novos métodos de controle de fitopatógenos de solo.

Ryu et al. (2004) demonstraram indução de resistência sistêmica em *Arabidopsis* por COVs produzidos por *Bacillus subtilis* GB03 e *B. amyloliquefaciens* IN 937a, reduzindo a severidade da podridão mole causada por *Erwinia carotovora* sp. *carotovora*. Zhang et al. (2007) constataram que o *B. subtilis* GB03 produz COVs que aumentam a produção de hormônios em *Arabidopsis*, levando à expansão celular, podendo assim explicar a promoção do crescimento de plantas por rizobactérias.

Zou et al. (2007) encontraram 328 isolados bacterianos capazes de produzir COVs antifúngicos, que inibiam a germinação de esporos e o crescimento micelial de *Paecilomyces lilacinus* e *P. chlamydosporia*. Fernando et al (2005) isolaram bactérias, a partir de canola e soja, que produziam COVs antifúngicos.

Pouco se sabe sobre os COVs nematicidas e seus potenciais usos como agentes de controle biológico contra fitonematoides. Gu et al. (2007) constataram a produção de COVs por bactérias com atividade nematicida contra *Panagrellus redivivus*, um nematoide de vida livre, e contra *Bursaphelenchus xylophilus*. A exposição dos nematoides aos COVs diminuiu gradativamente a

capacidade de movimentação dos juvenis, entre 1 e 12 h, com imobilidade total após 24 h, para a maioria. As principais bactérias produtoras de COVs foram *B. weihentephanensis*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Huang et al. (2010) constataram que os COVs produzidos por *B. megaterium* YMF3.25 causaram alta mortalidade de J2 de *M. incognita* e elevada inibição na eclosão e imobilidade total de J2 após 24 h.

A literatura mundial tem descrito a utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa como um meio de identificação de COVs. Gu et al. (2007) detectaram moléculas de COVs, de bactérias isoladas do solo, como alcoóis, aldeídos, cetonas, alquenos, entre outros. Dos 20 COVs com atividade nematicida, nove (fenol, octan-2-ol, benzaldeído, feniletanal, decanal, nonan-2-ona, undecan-2-ona, ciclohexeno e dissulfeto de dimetila) causaram 100% de controle dos nematoides *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus*. Cinco compostos (α -terpineol, feniletanol, propanona, acetofenona e nonano) mostraram diferentes atividades nematicidas contra *B. xylophilus* (75–100%) e *P. redivivus* (17–100%). Através da mesma técnica, Huang et al. (2010) caracterizaram que a maioria dos COVs produzidos por *Bacillus megaterium* YMF3.25 compreendiam feniletanal, decanal, nonan-2-ona, undecan-2-ona e dissulfeto de dimetila, que foram antagonistas aos ovos e J2 em concentração de 0,5 mmol.L⁻¹. Seis outros compostos (acetofenona, nonano, fenol, 3,5-dimetoxitolueno, 2,3-dimetilbutanodinitrila e 1-etenil-4-metoxibenzeno) apresentaram atividade nematicida entre 30 e 63%. Portanto, a identificação de COVs pode ser uma importante ferramenta para a formulação de novos produtos nematicidas.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os métodos disponíveis para o controle de *Meloidogyne* spp. não apresentam a desejada eficiência, que acarreta perdas aos agricultores além de elevar o custo de produção. Além disso, como se baseiam em grande parte no emprego de substâncias de alto poder biocida, seus efeitos se manifestam na contaminação do homem e do meio ambiente com substâncias de elevada toxicidade e no aumento dos custos da produção. Para contornar tal problema, faz-se necessário desenvolver novos produtos, mais eficientes e menos tóxicos que aqueles atualmente disponíveis. Para tanto, uma possível alternativa consiste no estudo dos metabólitos de origem bacteriana, já que os mesmos se mostraram ativos contra *Meloidogyne* spp. em estudos preliminares. Como várias dessas substâncias podem ser produzidas com baixos custos e apresentam baixa toxicidade, identificá-las poderá contribuir para o desenvolvimento de novos nematicidas. Além disso, poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação de várias bactérias contra nematoides, que será de grande importância para o emprego de bactérias no controle de fitonematoides.

REFERÊNCIAS

ALI, N. I. et al. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 8, p. 1051-1058, Aug. 2002.

ARAVIND, R. et al. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 4, p. 318-324, Apr. 2010.

BARBOSA, L. C. A. et al. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Nematropica**, Bradenton, v. 29, n. 1, p. 81-88, June 1999.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causadas por fitonematoides**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 124 p.

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.

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, abr./jun. 1998.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 501-538, Sept. 2003.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HALMMAN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, Oct. 1997.

HALMMAN, J. et al. Endophytic rhizobacteri as antagonist of *Meloidogyne incognita* cucumber. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 10, p. 11-36, Oct. 1995.

_____. Enphytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 4, p. 415-422, Apr. 2001.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.

IONOMOTO, M. M. **Estudo taxonômico de nematoides fitoparasitos coletados no “campus” Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, Brasil.** 1995. 95 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1995.

KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, Dec. 2009.

KARSSSEN, G. **The plant-parasitic nematode: genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe.** Boston: Brill Academic, 2002. 157 p.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas.** 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314 p.

MADIGAN, M. M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. E. **Brock biology of microorganisms.** New York: Prentice Hall, 2003. 1104 p.

MAHAFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 333-342, Apr. 1997.

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFPE, 2005. p. 1-18.

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

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Induced systemic resistance of selected endophytic bacteria against *Meloidogyne incognita* on tomato. **Communications in Applied Biological Sciences**, New York, v. 66, n. 3, p. 663-669, May 2001.

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, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-Knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, Nov. 2009.

OSMAN, G. Y. Effect of amino-acids and ascorbic acid on *Meloidogyne javanica* Chitw. (Tylenchidae, Nematoda). **Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, Berlin, v. 66, n. 7, p. 140-142, 1993.

PADGHAM, J. L.; SIKORA, R. A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 7, p. 971-977, July 2007.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, New York, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PINHO, R. S. C. et al. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 54-60, jan./mar. 2009.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 577-582, Sept. 1997.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 417 p.

RYU, C. M. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, n. 3, p. 1017-1026, Apr. 2004.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

SIDDIQI, M. R. **Tylenchida: parasites of plants and insects**. New York: CAB International, 2000. 833 p.

SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Effects of *Verticillium chlamydosporium* and *Pseudomonas aeruginosa* in control of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Nematologia Mediterranea**, Bologna, v. 28, n. 2, p. 193-196, 2000a.

_____. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot-root knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterranea**, Bologna, v. 28, n. 2, p. 189-192, 2000b.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Endophytic bacteria: prospects and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Nematologia Mediterranea**, Bologna, v. 31, n. 3, p. 111-120, 2003.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 4, p. 413-416, Apr. 2005.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.

WHEATHEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediate bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, p. 357-364, Nov. 2002.

ZACHEO, G. Introduction. In: KHAN, W. W. (Ed.). **Nematode interactions**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 1-25.

ZHANG, H. et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 4, p. 839-851, 2007.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, May 2002.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**Activity of volatile organic compounds from endophytic bacteria on the
nematode *Meloidogyne incognita***

Prepared in accordance with the European Journal of Plant Pathology
(Preliminary version)

Renata Silva Canuto de Pinho, Vicente Paulo Campos, Denilson Ferreira de
Oliveira, Ricardo Magela de Souza, Adrian M. Polhit, Márcia de Oliveira Souza,
Juliana Resende Campos Silva

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) production by soil and plant-rhizosphere bacteria toxic to nematodes create another view of antagonism between them and strengthen the role of soil suppression by those microorganisms to plant-parasitic nematodes. In the present work, 36 endophytic bacteria were tested for the VOC antagonism to the nematode *Meloidogyne incognita* J2, whereas only 30.6% and 38.9% caused very strong and strong mortalities, respectively. Among the isolates that simultaneously caused very strong immobility and mortality were: *Bacillus pumilus* (four isolates), *B. sphaericus* (three isolates), *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans* and P 11 (non-identified species). The exposure of *M. incognita* J2 to VOCs produced by *B. sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) VOCs highly decreased egg-hatching, infectivity on tomato and body lipid energy. By gas chromatography analysis, 12, 4 and 3 molecules were identified from is. 43 (*B. sphaericus*) is. 51 and 52 (*B. pumilus*), respectively. Some molecules found in bacterium VOCs i.e. dodecanone, 2,4-di-tert-butylphenol (BHT), 2-ethyl-1-hexanol, 4-methylnonane, caused low *M. incognita* J2 mortality or none when the commercial products were tested. On the other hand, linalool produced by *B. sphaericus* (is. 43) showed high J2 mortality when the commercial product was tested. Bacteria produced diversified and mixed molecules with different nematicidal activities demonstrated by commercial product tests whose molecular combinations with high nematicidal activities may lead, in the future, to the finding of new efficient volatile nematicides.

Keywords: Biological Control. Root-Knot. Endophytic Bacteria. *Bacillus sphaericus*. *Bacillus pumilus*.

RESUMO

Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por bactérias do solo e da rizosfera tóxicos aos nematoides criam uma outra visão do antagonismo entre eles e reforça o papel da supressividade do solo pelos microrganismos aos fitonematoides. No presente trabalho, COVs de 36 bactérias endofíticas foram testados no antagonismo ao nematoide *Meloidogyne incognita*. A maioria deles (94,4%) causou imobilidade muito forte de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* enquanto apenas 30,6% e 38,9% causaram mortalidade muito forte e forte, respectivamente. Entre os isolados que, simultaneamente, causavam imobilidade e mortalidade muito fortes estão: *Bacillus pumilus* (quatro isolados), *B. sphaericus* (três isolados), *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus macerans* e P 11 (espécie não-identificada). A exposição de J2 de *M. incognita* aos COVs produzidos pelo *B. sphaericus* (is. 43) e *B. pumilus* (is. 51 e 52) reduziu bastante a eclosão, a infectividade de J2 em tomateiro e a energia corporal (lipídios). Foram identificadas, por cromatografia gasosa, 12, 4 e 3 moléculas a partir do is. 43 (*B. sphaericus*) is. 51 e 52 (*B. pumilus*), respectivamente. Algumas moléculas encontradas nos COVs bacterianos, isto é, dodecanona, 2,4-di-terc-butilfenol (BHT), 2-etil-1-hexanol, 4-metilnonano causaram baixa ou nenhuma mortalidade de J2 de *M. incognita*, quando os produtos comerciais equivalentes foram testados. Entretanto, o linalool produzido por *B. sphaericus* (is. 43) apresentou alta mortalidade de J2 quando foi testado o produto comercial. As bactérias produziram moléculas diversificadas com diferentes atividades nematicida demonstrado pelos testes com produtos comerciais. Combinações de moléculas, com alta atividade nematicida, podem levar, no futuro, à descoberta de novos voláteis nematicidas eficientes.

Palavras-chave: Controle biológico. Nematoide de galhas. Bactéria endofítica. *Bacillus sphaericus*. *Bacillus pumilus*.

1 INTRODUCTION

Plant-parasitic nematodes cause annual yield losses of about 100 billion dollars worldwide with 70% of the damage attributed to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) (SASSER; FRECKMAN, 1987). One of the root-knot species, *Meloidogyne incognita*, causes extensive crop loss worldwide including coffee (CAMPOS; VILLAIN, 2005; LUC et al., 2005).

The parasitism of the nematode *Meloidogyne* spp. in plants results in plant-transformed cells called giant cells and egg-mass deposition at the end of its life cycle, are both nutrient enriched media for microorganisms, specially bacteria (KOK et al., 2001). Bacterium species are abundant in soil and the plant rhizosphere including the infection sites of many plant pathogens besides nematodes. About 50 g of bacteria is found in 1m² of soil (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). The association of bacteria to plants (rhizobacteria and endophytic bacteria) is known to occur in many rhizospheres (HALLMAN et al., 1997; MAHAFFEE; KLOPPER, 1997) with a few antagonistic to plant-parasitic nematodes (KLOPPER et al., 1991) whose mode of action is not well understood. Some bacterial species may restrict the population increase of plant pathogens and damage caused by them, mostly by releasing water soluble and volatile substances to which some of them may be of interest for the control of the plant pathogens.

Volatile organic compounds (VOCs) are involved in the antagonistic action of bacteria against many organisms (KAI et al.; 2009). The antagonistic VOC-producing bacteria have been studied in the last decade (FERNANDO et al., 2005). Bacterium VOCs are involved in soil fungistasis (CAMPOS et al., 2010). Many fungi including those involved in the control of nematodes (*Arthrobotrys conoides*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*) as well as plant pathogenic fungi (*Sclerotinia sclerotiorum*) suffer a deleterious

effect by bacterial VOCs (FERNANDO et al., 2005; ZOU et al., 2007). Nematicidal activity of bacterial VOCs have been shown against nematodes *Bursaphelenchus cocophyllus*, *Panagrellus redivivus*, *Meloidogyne incognita*, but mostly based only on mortality tests (GU et al., 2007; HUANG et al., 2010). Expansion of the research to other nematode life cycle phases as well as the search for the similar effect by other bacterial species and identification of volatile molecules toxic to nematodes are needed. Thus, the objectives of this work were: 1) to estimate the nematicidal activities of the VOC from endophytic bacteria previously isolated from tomato stem against different stages of *Meloidogyne incognita* including the prevention of infection by VOCs exposed J2 and VOC exposed J2 body energy loss evaluation; 2) identify the nematicidal VOCs from bacterial isolates by gas chromatography-mass spectrometry analysis, followed by the nematicidal tests with commercial VOCs products.

2 MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates: after previous screening, a total of 36 endophytic bacterium isolates were examined for their potential to produce nematicidal VOCs. These bacterial isolates were previously isolated from tomato and red pepper stems (SILVA et al., 2008) and provided by the Plant Pathology Department collection of the Federal University of Lavras, Brazil. These isolates were incubated in peptone-glycerol medium (peptone 20.0 mL, glycerol 10.0 mL, 1.5 g K₂HPO₄, distilled water) and stored at -80°C until use. Prior to our experimentation, the stock cultures were streaked onto tryptic soy agar medium (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) and incubated at 28°C for 24h.

Nematodes: in this study, the nematode *Meloidogyne incognita* (second stage juveniles – J2 and eggs) was used for the whole *in vitro* and infectivity tests. *M. incognita* was cultured on tomato plants in greenhouse. After three months, eggs were obtained from galled roots following Hussey and Barker (1973) procedure. Eggs were placed in hatch chambers and hatching was assessed. J2 were collected and used for *in vitro* and infectivity tests, body lipid content evaluation and for commercial VOC product tests.

***In vitro* nematicidal activity of bacterial VOCs (J2 immobility and mortality tests):** nematicidal activity (NA) of bacterial VOCs was tested according to the method of Fernando et al. (2005) with some modifications. Briefly, in a two-compartmented Petri dish, 300 µL of the fresh bacterial culture were inoculated in TSA medium in one compartment and a layer of water agar (WA) was added to the other compartment. About 200 *M. incognita* J2 were added, on the other side, onto the WA surface after one day of bacterial growth. As a control, the same amount of TSA medium, without bacterial inoculation, was added to one compartment, and the tested nematode on the opposite side. For each bacterial

isolate, the test was carried out in 4 replicates. Plates were immediately wrapped with PVC to prevent the escape of the volatiles. The plates were organized in complete randomized design. After incubating at 28°C in the dark for 72 hours, the numbers of mobile and non-mobile J2 were recorded under a microscope. The Chen and Dickson (2000) method was used to check for mortality when J2 showed immobile. Briefly, NaOH 1 N was added to J2 suspension and J2 was considered dead when no movement was observed. The assay was repeated three times.

Hatching of *Meloidogyne incognita* J2 from eggs after exposure to bacterial VOCs: recently grown bacterial isolates (*B. sphaericus* – is. 43, *B. pumilus* – is. 51 and 52), selected for this experiment, were streaked onto TSA medium placed in one compartment and a layer of WA was added to the opposite compartment. About 1000 *M. incognita* eggs were added onto the WA surface when the bacterial growth was 1 day old. As a control, TSA medium was placed in one compartment and egg suspension in water in the other compartment on the WA surface. Four plates (replicates) were used for each bacterium isolate, and organized in completely randomized design. Plates were immediately wrapped with PVC to prevent the escape of the volatiles. After incubating at 28°C in the dark for 10 days, the hatched J2 were counted under a microscope. The assay was repeated three times.

Exposure time evaluation of bacterial VOCs on J2 of *Meloidogyne incognita*: three bacterial isolates (is. 43, 51 and 52) with high mortality levels in a previous assay (Table 1) were selected for this study. The setup described in NA tests was also used to expose 500 J2 of *M. incognita* for 0, 24, 48, 72 and 96 hours in four replicates each, to bacterial VOCs. The plates were arranged in completely randomized design. After incubating at 28°C in the dark, numbers of

non-mobile and dead J2 were recorded under a microscope. The assay was repeated twice.

Infectivity of *Meloidogyne incognita* J2 on tomato after exposure to bacterial VOCs: bacterial isolates 43, 51 and 52 with very strong immobility and mortality levels to *M. incognita* J2 in previous test (Table 1) were selected to carry out this experiment. The setup described in NA tests was also used to expose 500 J2 – stage *M. incognita* to bacterial VOCs for 24, 48, 72 or 96 h. As a control, water was substituted for the bacterium. About 500 exposed J2 were inoculated on twenty five – day – old tomato seedlings through four holes (1.5 cm deep) in the substrate around the plant base using a micropipette. Seedlings were arranged in randomized block design with four replicates and placed in a temperature controlled room at 28°C with a 12 h photoperiod. Thirty days after J2 inoculation, root systems were harvested, washed gently, weighed and galls were counted. Galls per gram of roots were estimated after dividing the total per root weight. The assay was repeated three times.

***Meloidogyne incognita* J2 lipid content after exposure to bacterial VOCs:** J2 body lipid content was determined according to the method of Christophers et al. (1997) with some modifications, after exposure to bacterial VOCs for 24, 48, 72 and 96 hours or water (control). The assay followed the procedure used for the infectivity test, described previously. Briefly, Oil Red O (3.0 mL solution 0.5%) was added to the J2 water suspension and heated in a water bath at 60°C for 20 min. After cooling at room temperature, the suspension containing stained J2 was centrifuged for 3 min at 1416 g. The supernatant was eliminated and 1.5 mL of a glycerin water solution (1:1) was added to the J2 suspension. Twenty randomly chosen J2, were mounted on a microscope slide with glycerin and photographed. The red-stained area of the J2 body, corresponding to lipids, and

the full area of the nematode body were calculated by analyzing the photographs with the “Quant” software. Measurement of the red-stained area allowed us to infer lipid percentage in relations to the full J2 body area. The assay was repeated twice.

Identification of bacterial VOCs by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME): *B. sphaericus* (43) and *B. pumilus* (51 and 52) isolates were selected to carry out this analysis since they caused increased immobility and mortality levels to *M. incognita* J2 exposed to their VOCs. Bacterial from recently grown colonies were inserted into vials containing liquid TSB medium and shaking-incubated at 28°C for seven days at 0.34 g speed. After centrifugation the supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane. Aliquots of 9 mL of the filtered fungal culture were transferred to 80 × 28 mm (40 mL internal volume) sterilized Supelco™ SPME glass vials sealed with silicone septas and stored at 0-4 °C. The volatiles were collected on a 100 µm fused silica-non-bonded polydimethyl siloxane (PDMS) Supelco™ Fiber Core. The fiber was introduced into the headspace of each vial using a Supelco™ Solid-Phase Micro Extraction Fiber Manual Holder. After insertion of the fiber, the vial was warmed in a 45°C water bath for 30 min. Each extraction was performed in duplicate and exposed for 3 min in the injector of a Shimadzu Gas Chromatograph (Model GC-2010)-Mass Spectrometer (Model QP2010) running GCMS Solution Release 2.30 Software. Analysis conditions: injector temp. 220 °C, splitless, injection mode: splitless, sampling time 1.5 min, flow control mode: linear velocity, press.: 64.7 kPa, total flow: 16.3 ml/min, column: DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm), carrier gas: helium, column flow: 1.21 ml/min, linear velocity: 39.7 cm/s, split ratio: 10, oven temp.: 40.0°C (5 min), rate 5.0°C/min to 28°C (48 min), 280°C (15 min). Equilibrium time: 2.0 min, ion source temp: 250°C, interface temp.: 280°C,

solvent cut time: 1.50 min, detector gain mode: relative, detector gain: 0.0 kV, threshold: 1000, acquisition mode: scan, interval: 0.30 s, scan speed: 1250, m/z range: 50.00-400.00. Chromatogram peak mass spectra were compared to Wiley 7.0, NIST 12 and NIST 62 mass spectral libraries.

Nematicidal tests of commercial VOC products: commercial VOC products which were mostly produced by *B. sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) (table 3) were purchased from Sigma, St. Louis, MO. Their nematicidal activities were assessed by the following methods. A 100 μ L of each compound was pipetted on sterilized filter paper discs and placed on the TSA medium in one compartment of the Petri dish. On the other compartmental side 2 mL of *M. incognita* J2 suspension with about 200 J2 were poured. As a control only TSA medium was placed in one compartmental side, and the nematode suspension on the opposite side. For each tested commercial compound four plates (replicates) were used. The experimental design was completely randomized. The plates were sealed with PVC to prevent the escape of volatiles and incubated at 28°C for 24 hours. Then the numbers of mobile and immobile J2s were counted under microscopy. The immobility was checked for mortality by methods described by Chen and Dickson (2000). The assay was repeated twice.

Data analysis and statistics: for the assays: nematicidal activities, egg-hatching, J2 exposure time evaluation and commercial product tests the data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and the means were grouped by Scott and Knott (1974) test. Nematicidal activity – NA (mortality and immobility) was calculated as the means of four replicates. VOC categories were built based on grouping analysis done by Scott and Knott test (1974) at 5% probability, then defining: I- Low (immobility NA<76.43%; mortality $0 \leq \text{NA} \leq 47.23\%$), II- Moderate (immobility NA=76.43%; mortality

51.63% \leq NA \leq 63.56%); III- Strong (immobility NA=88.00%; mortality 72.62% \leq NA \leq 86.60%); IV- Very strong (immobility 97.31% \leq NA \leq 100%; mortality 90.53% \leq NA \leq 100%). In galls per gram of roots, eggs per gram of roots and J2 percentage lipid (body lipid content) data regression analyses were used.

3 RESULTS

***In vitro* nematocidal activity of bacterial VOCs (J2 immobility and mortality)**

VOCs from bacterial isolates showed diverse effects (none, low, moderate, strong and very strong) on *M. incognita* J2. Most of isolates (94.4%) caused very strong immobility, whereas only 30.6% and 38.9% caused very strong and strong mortalities, respectively. Among the species and isolates that caused very strong mortality and immobility were *B. pumilus* (four isolates) *B. sphaericus* (three isolates), *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, (1 isolate) *Paenibacillus macerans* and P11 (1 isolate) (non-identified species), thus demonstrating high VOC nematocidal activity of the genus *Bacillus*. The remaining species and isolates caused low and moderate mortality and immobility (Table 1).

Table 1 Bacterial isolate (identified by sequential numbers) with nematicidal activities (NA) *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles (J2).

Bacteria species	Number of isolates	Isolate notations into different NA categories							
		Immobility				Mortality			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2				1, 10	10		1	
<i>Bacillus pumilus</i> subg. <i>B</i>	1		27			27			
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7			32	21, 22, 28, 36, 41, 50	41, 32, 50		21, 22, 28	36
<i>B. subtilis</i>	2				19, 31	31		19	
<i>B. sphaericus</i>	5				42, 43, 45, 53, 54	45	53		42, 43, 54
<i>B. pumilus</i>	10				3, 8, 12, 20, 26, 39, 48, 49, 51, 52		3, 8	12, 20, 26, 39	48, 49, 51, 52
<i>B. marinus</i>	1				44			44	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1				18			18	
<i>B. cereus</i>	1				13				13
<i>Paenibacillus gordonae</i>	2				37, 40		37	40	
<i>P. macerans</i>	1				47				47
No identified (P11)	3				2, 4, 11			2, 4	11
Total	36	0	1	1	34	7	4	14	11

I- Low; II- Moderate; III- Strong; IV- Very strong. Each category is different from each other at 5% probability according to Scott and Knott (1974).

Hatching of *Meloidogyne incognita* J2 from eggs after exposure to bacterial VOCs

The VOCs from the *B. sphaericus* (isolate 43), *B. pumilus* (isolates 51 and 52) bacterial isolates tested caused an *M. incognita* J2 hatching decrease of 98.4% (Table 2).

Table 2 Number of second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita* hatched after ten days of exposure to volatile organic compounds produced by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus pumilus*.

Bacterial species	Number of J2
Control	258.00 b
<i>B. sphaericus</i> (is. 43)	4.00 a
<i>B. pumilus</i> (is. 51)	3.75 a
<i>B. pumilus</i> (is. 52)	4.75 a

Means followed by same letter are not significantly different according to Scott and Knott's test at 5% probability.

Exposure time evaluation of bacterial VOCs on J2 of *Meloidogyne incognita*

The exposure (24h to 96h) of *M. incognita* J2 to VOCs produced by *B. sphaericus* (isolate 43) and *B. pumilus* (isolates 51 and 52) highly increased the J2 immobility and mortality over time. VOC production by the three bacterial isolates tested was weak, without difference ($P \leq 0.05$) among them at 24h exposure time. At 48h, difference among the tested isolates was observed, when is. 43 (*B. sphaericus*) produced lowest ($P \leq 0.05$) VOCs toxic to *M. incognita* J2 measured by immobility and mortality. The VOC production by the three isolates (is. 43, 51 and 52) toxic to *M. incognita* J2 levels rose at 72h and 96h J2 exposure time, without statistical difference among them (Figure 1).

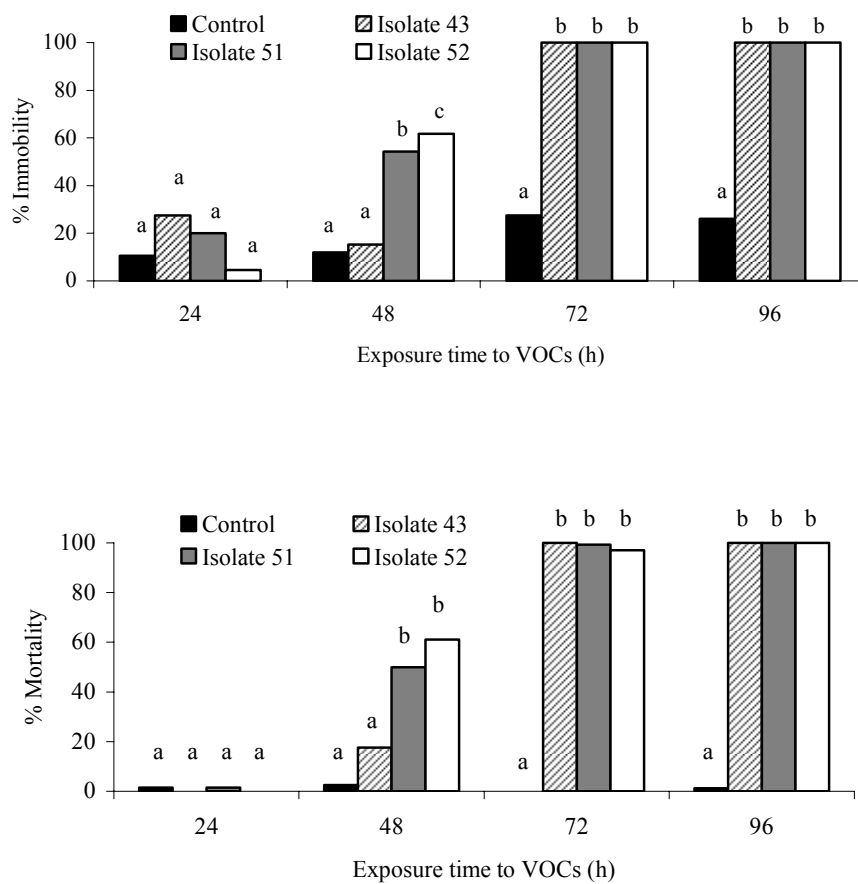


Figure 1 Immobility and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* after exposure to volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic bacteria. In each exposure period, means in bar followed by same letter are not significantly different according to Scott and Knott's test at 5% probability.

Infectivity and lipid content of *Meloidogyne incognita* J2 exposed to bacterial VOC

Infectivity, based on galls or eggs/g of root, of the J2 exposed or not to VOCs from bacterial isolates on tomato decreased overtime from 24 h to 96 h exposure. However the exposure of J2 to bacterial VOCs made this infectivity reduction even greater compared to the control (J2 not exposed to VOCs), the *B. sphaericus* (is. 43) having the least reduction (Figures 2 and 3).

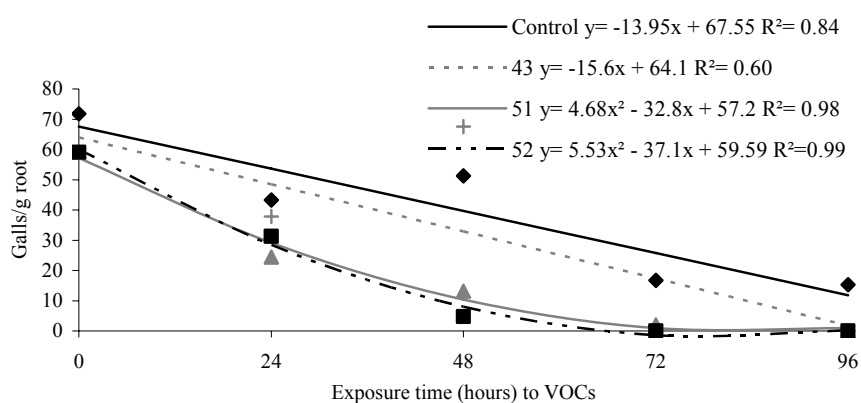


Figure 2 Number of galls per gram of tomato root after exposure of second-stage juveniles to volatile organic compounds (VOCs) produced by *Bacillus sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52).

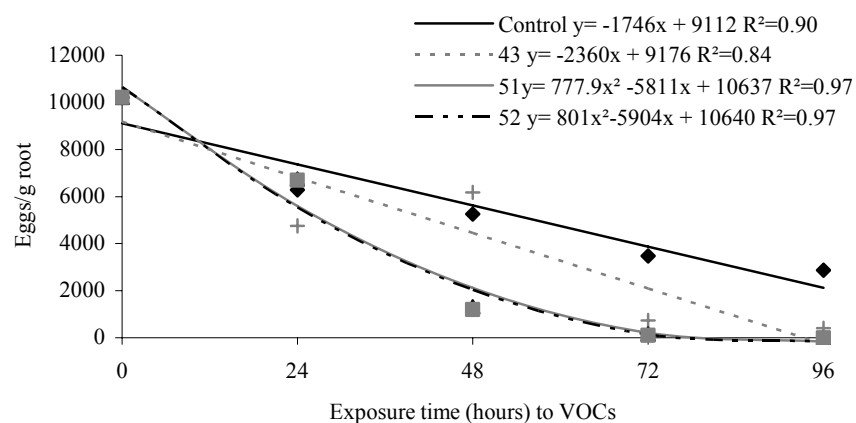


Figure 3 Number of eggs of *Meloidogyne incognita* per gram of tomato root after exposure of second-stage juveniles to volatile organic compounds (VOCs) produced by *Bacillus sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52).

As found in the infectivity tests, the reduction of J2 lipid content occurred from 24h to 72h in all J2, but was even greater when J2s were exposed to the *B. sphaericus* (is.43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) VOCs compared to the control (Figure 4).

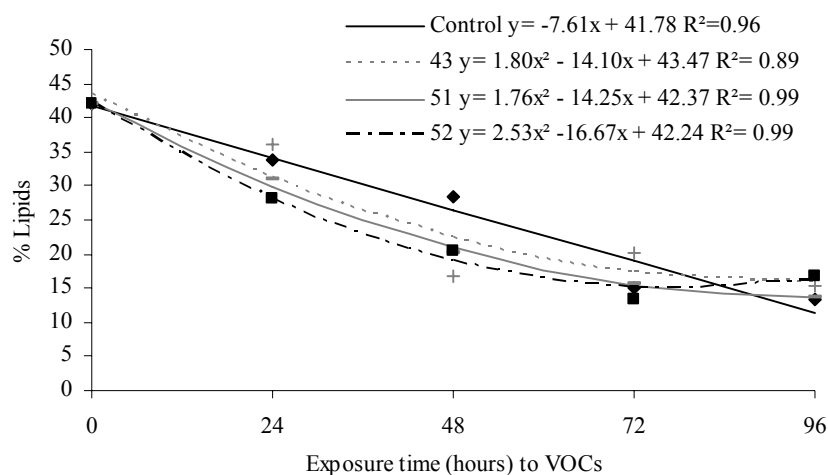


Figure 4 Percentage of lipid in second-stage juvenile of *Meloidogyne incognita* after exposure to volatile organic compounds (VOCs) produced by *Bacillus sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52).

Identification of bacterial VOC by chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

Analysis by GC/MS of the VOCs produced by isolate 43 (*B. sphaericus*) isolates 51 and 52 (*B. pumilus*) revealed the presence of 12, 4 and 3 substances, respectively. Many molecules found in high amounts, based on the total VOC percentage, were encountered in VOCs of isolates 51 and 52 (*B. pumilus*). *B. sphaericus* is. 43 and *B. pumilus* is. 52 produced some similar molecules (4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol; 2,4-di-tert-butylphenol), whereas completely different compounds were produced by *B. pumilus* is. 51. However dodecanone, found as 44.38% of the total VOCs of is. 51 (*B. pumilus*), showed only 25.8% mortality when the 2-dodecanone commercial product was tested against *M. incognita* J2. Also 2,4-di-tert-butylphenol know as butylated hydroxytoluene

(BHT), found as 56.69% of total VOCs of is. 52 (*B. pumilus*) showed no effect on J2 mortality when 2,6-bis(1,1-dimethylethyl) phenol and 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol commercial product was tested against *M. incognita* J2. 2-ethyl-1-hexanol found as 19.22% of the total VOCs of is.52 (*B. pumilus*) showed only 31.9% of J2 mortality when its commercial product was tested (Table 3).

Table 3 Major volatile organic substances produced by *Bacillus sphaericus* (is. 43) *B. pumilus* (is. 51 and 52), quantified and identified by gas chromatography-mass spectrometry.

Bacterial	Retention time (min)	Substance^a	Amount (%)^b
<i>B. sphaericus</i> (43)	2.831	2-methyl-1-Propanamine	5.23
	4.205	3-methyl-1-Butanamine	3.69
	6.518	propionoin or 4-hydroxy-3-hexanone	1.09
	15.937	prop-2-yn-1-yl propanoate	1.15
	17.795	linalool or 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	0.2
	20.416	4-methylnonane	4.38
	21.746	1-(2-hydroxyethoxy)tridecane	3.15
	25.035	3-methylbutyl 2-phenylethylidene amine	1.67
	26.546	2,6-dimethyloctane	0.04
	28.011	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol or 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol	4.03
	28.132	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol or 2,4-di-tert-butylphenol	2.29
	30.053	2,4,4-trimethylpentane-1,3-diyl bis(2-methylpropanoate)	1.39
<i>B. pumilus</i> (51)	27.058	1-tridecanol or tridecan-1-ol	17.67
	28.015	meso-2,3-diethyl-2,3-dimethyl-1,4-butanediol	6.83
	28.137	6-dodecanone	44.38
	34.326	7-methyl-2-octyne	2.13
<i>B. pumilus</i> (52)	14.352	2-ethyl-1-hexanol	19.22
	28.013	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol or 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol	3.55
	28.128	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol or 2,4-di-tert-butylphenol	56.69

^a Obtained by comparison of the mass spectra to Wiley 7.0, NIST 12 and NIST 62 mass spectral libraries. ^b Percentage = (area of the peak corresponding to the substance in the chromatogram) x 100/(sum of areas of all peaks in the chromatogram).

Nematicidal tests of commercial VOC products

Of the 23 commercial compounds tested, six showed J2 immobility and mortality above 80%, three (1-octanol, linalool and 2-undecanone) caused J2 mortality from 63.6% to 71.3%, and the remaining compounds caused J2 mortality below 31.9%. All commercial compounds tested caused higher immobility than mortality. However, benzeneethanol and 2-butoxy-ethanol caused immobility from 83.3% to 90% and mortality from 2.2% to 17.5%. On the other hand, many commercial compounds similar to bacterial VOC molecules fail to cause toxicity on *M. incognita* J2. The commercial compounds presented in VOCs of *B. sphaericus* is 43 and *B. pumilus* is 52 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol and 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-phenol caused any immobility and mortality of *M. incognita* J2. Of the three molecules identified in *B. pumilus* is 52 VOCs, the commercial compound tested, the 2-ethyl-1-hexanol, caused only moderate J2 mortality (31.9%) (Table 4).

Table 4 Nematicidal activities of volatile organic compounds (VOCs) tested according to commercial compounds.

Substances	J2 Immobility (%)	J2 Mortality (%)
Control	5.3 g	1.8 f
2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol (99%)	5.7 g	0.0 f
2,6-dimethyl-4-heptanone (96%)	54.7 d	1.2 f
Nonane (99%)	5.7 g	1.8 f
2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-phenol (99%)	9.3 g	1.9 f
2-butoxy-ethanol (99%)	83.3 b	2.2 f
2,6-dimethylpyrazine (98%)	38.0 e	3.6 f
2,5-dimethylpyrazine (98%)	25.3 f	3.9 f
2,4,4-trimethyl-1-pentene (96 %)	44.3 e	4.2 f
Terpineol (96%)	30.0 f	4.5 f
Decanal (98%)	21.3 f	13.6 e
6-undecanone (97%)	25.7 f	15.8 e
Benzeneethanol (98%)	90.0 a	17.5 e
2-dodecanone (97%)	55.0 d	25.8 d
2-ethyl-1-hexanol (99%)	65.3 c	31.9 d
1-octanol (99%)	95.7 a	63.6 c
3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool) (97%)	96.3 a	69.2 c
2-undecanone (99%)	78.0 b	71.3 c
2-decanone (98%)	97.0 a	82.4 b
2-nonanone (97%)	98.7 a	92.1 a
(+/-) 2-octanol (96%)	100.0 a	98.0 a
3,3,5-trimethyl-cyclohexanone (98%)	100.0 a	98.3 a
3-octanol (99%)	100.0 a	98.9 a
Benzaldehyde (98%)	100.0 a	100.0 a

Means followed by same letter in a column are not significantly different according to Scott and Knott test at 5% probability.

4 DISCUSSION

Emission of volatiles by bacteria has been known for a long time (STOTZKY; SCHENK, 1976; KAI et al., 2009), involving mostly rhizobacteria and soil bacteria with few tests on VOC antagonism to plant-parasitic nematodes (CAMPOS et al., 2010). The rhizobacterium *Bacillus megaterium* YMF 3.25 VOCs caused reduction of egg-hatching and high J2 mortality of *M. incognita* (HUANG et al., 2010). VOCs from 22 and 7 isolates of bacteria isolated from soil caused 100% mortality of the nematode *Panagrellus redivivus* and *Bursaphelenchus xylophilus*, respectively (GU et al., 2007). In our work, the endophytic bacterium isolates showed different nematicidal activities capacities on *M. incognita*.

The quantitative difference in VOC production by three endophytic bacterial isolates toxic to *M. incognita* J2 at 48h exposure and equal production after 72h indicates that some bacterial isolates produce toxic VOCs earlier. However, for general isolate screening, the exposure time should be at or above 72 h of gas storage together with the tested nematode.

Meloidogyne J2, normally, uses its body energy reserve (lipid) during starvation conditions which can occur in the field or under lab storage (CAMPOS et al., 2006; ROCHA et al., 2010). However, in this work, it was demonstrated that *M. incognita* J2 body energy reserve (lipid) decreases even greater when J2 are exposed to bacterial VOCs. Nematodes exposed to pesticide solutions also decrease their body energy (lipids) (ANDALÓ et al., 2009).

Once body energy reserves (lipids) drop when *M. incognita* J2 is exposed to *B. sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) VOCs, the infectivity on tomato drops to the same extent because the amount of the lipid reserves in J2 correlates to infectivity in plants (CAMPOS et al., 2006; ROCHA

et al., 2010) and measures the inoculum pathogenicity capacity (CHRISTOPHER et al., 1997).

In conclusion, *B. sphaericus* (is. 43) and *B. pumilus* (is. 51 and 52) VOCs reduce the inoculum pathogenicity of *M. incognita* demonstrating another mode of action of endophytic bacteria on the control of plant-parasitic nematodes besides leading to the search for a new fumigant nematicide by mimicking the naturally producing toxic molecules of VOCs by the bacteria and their proportions found as commercial compounds.

The similarities of VOC molecules produced by is. 43 (*B. sphaericus*) and is. 52 (*B. pumilus*) and lack of molecule predominance in the total VOC percentage of is. 43 (*B. sphaericus*) found in this work have also been encountered among other bacterial isolates tested by other researchers (FERNANDO et al., 2005; GU et al., 2007).

The high percentage (75.91) of the total VOCs produced by is. (*B. pumilus*) is due to two compounds, BHT and 2-ethyl-1-hexanol which are not toxic to *M. incognita* J2, and the remaining compound, produced by it, identified by gas chromatography is close to BHT with an extra 4-methyl in the molecule which might not be toxic to *M. incognita* J2. Thus, the explanation for the strong J2 mortality by is. 52 (*B. pumilus*) VOCs may involve the synergism among those compounds leading to a toxicity increase of the natural mixture in the bacterium VOCs or some minor compounds, undetected, might play an important role on the increased toxicity by the bacterium VOCs.

BHT and 2-ethyl-1-hexanol are produced by *Fusarium oxysporum* and bacteria isolated from canola and soybean (FREIRE et al., 2011; FERNANDO et al., 2005). But 2-ethyl-1-hexanol produced by bacteria was efficient in reducing the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* (FERNANDO et al., 2005).

Linalool found in is. 43 (*B. sphaericus*) VOCs showed high J2 mortality (69.2%) when its commercial product was tested. Linalool is the component of

the plant *Pelargonium graveolens*. The linalool, at the concentration of 2000 mL/L, caused 100% *M. incognita* J2 mortality (LEELA et al., 1992) On the other hand, 4-methylnonanone found in is. 43 (*B. sphaericus*) VOCs showed no effect on J2 mortality when the commercial product nonanone was tested. However 2-nonanone has been produced by *Bacillus megaterium* YFM3.25, soil bacteria and bacteria isolated from canola and soybean (HUANG et al., 2010; GU et al., 2007; FERNANDO et al., 2005). The commercial product 2-nonanone tested *in vitro* showed strong nematicidal activities against *M. incognita*, *P. redivivus* and *B. xylophilus* (HUANG et al., 2010; GU et al., 2007). Therefore, the mixture of VOC molecules with different efficiency degree on J2 mortality naturally produced by the bacterium is. 43 (*B. sphaericus*) might explain the nematicidal activity showed by the *in vitro* test in this work with pure culture of the bacterium.

Among other commercial products tested against *M. incognita* J2 in this work, some were not found in the tested bacteria *B. sphaericus* (is. 43), *B. pumilus* is. (51 and 52) VOCs, for example, terpineol, 2-octanol, benzaldehyde, 2-undecanone and benzeneethanol. However, Gu et al. (2007), found those molecules in soil bacteria. The effect of terpineol on *P. redivivus* and *B. xylophilus* mortality was 100% and 77.8%, respectively (GU et al., 2007). But, in our work herein, tested against *M. incognita*, J2 no effect was observed on mortality. 2-octanol and benzaldehyde caused 98% *M. incognita* J2 mortality in our test, and 100% mortality of *P. redivivus* and *B. xylophilus* by Gu et al. (2007) test. 2-undecanone caused 71.3% *M. incognita* J2 mortality in our tests and 100% mortality of *P. redivivus*, *B. xylophilus* and *M. incognita* J2 by Gu et al. (2007) and Huang et al. (2010) tests. Benzeneethanol caused low (17.5%) *M. incognita* J2 mortality in our work, but high *B. xylophilus* mortality and low *P. redivivus* mortality by Gu et al. (2007) tests.

In summary, *B. sphaericus* (is. 43) VOCs contains a high J2 toxic molecule, linalool, when tested separately with commercial product. Nevertheless, mixture with a mimicked component of bacterial VOCs using commercial products still needs to be done in the expectation that this mixture will be better than the separate VOC components.

Endophytic bacteria produce diversified and mixed molecules with different nematicidal activities demonstrated by commercial product tests whose molecule combinations with high nematicidal activities may lead, in the future, to finding a new efficient volatile nematicide.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the institutions in Brazil: station foundation, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, federal council for science and technology, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and federal coordination of higher education, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support. Special thanks from Pinho and Campos to research partners of this paper for the fruitful cooperative work.

REFERENCES

- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G. F. ; MAXIMINIANO, C. ; MOINO JR, A.; CAMPOS, V. P. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Mediterranea**, v. 37, n.1, p. 11-15, Jan. 2009.
- 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 lipídeo corporal, na penetração, no número de fêmeas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p. 387-394, jul./ago. 2006.
- CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.
- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd ed. Wallingford: CAB International Publishing. p. 529-579. 2005.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, n.1, p.117-121, Mar. 2000.
- 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.
- FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F.; POHLIT, A. M.; NORBERTO, N. P.; FARIA, M. R. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, 2011. (enviado para publicação)

GU, Y. Q.; MO, M. H.; ZHOU, J. P.; ZOU, C. S.; ZHANG, K. Q. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct, 2007.

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

HUANG, Y.; XU, C. K.; MA, L.; ZHANG, K. Q.; DUAN, C. Q.; MO, M. H. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.

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

KAI, M.; HAUSTEIN, M.; MOLINA, F.; PETRI, A.; SCHOLZ, B.; PEICHULLA, B. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, Dec. 2009.

KLOEPPER, J. W.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; MCINROY, J. A.; COLLINS, D. J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, v. 136, n. 1, p. 95-102, Jan. 1991.

KOK, C.J.; ARTEMIS, P.; BOK-A-BIN, C.B. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: Species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). **Nematology**, v.3, n.8, p.729-734, Aug. 2001.

LEELA, N.K.; KHAN, R.M.; REDDY, P.P.; NIDIRY, E.S.J. Nematicidal activity essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterrânea**, v. 20, n. 1, p. 57-58, Jan. 1992.

LUC, M.; SIKORA, R.A. BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd ed. Wallingford: CAB International Publishing. 2005. 871 p.

MAHAFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth promoting rhizobacterium or its genetically modified derivate. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 43, p. 333-342, Apr. 1997.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2^a ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006.726 p.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T. Variation in lipid reserves of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in a coffee field and its relationship with infectivity. **Nematology**, Leiden, v. 12, n. 3, p. 365-371, Mar. 2010.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

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.; SOUZA, R. M. ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae pv tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, jul./ago. 2008.

STOTZKY, G.; SCHENK, S. Volatile organic compounds and microorganisms. **CRC Critical Review of Microbiology**, v.4, n.4, p. 333-382, Apr. 1976.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

**Influência da liofilização e solubilização seletiva na atividade de metabólitos
bacterianos tóxicos a *Meloidogyne incognita***

Preparado de acordo com as normas da Nematologia Brasileira
(versão preliminar)

Renata S. C. Pinho, Vicente P. Campos, Denilson F. Oliveira, Fernando S.
Rocha, Ricardo M. Souza, Juliana, R. C. Silva

Resumo – Pinho, R. S. C., Campos, V. P., Oliveira, D. F., Rocha, S. F., Souza, R. M., Silva, J. R. C. 2010. Influência da liofilização e solubilização seletiva na atividade de metabólitos bacterianos tóxicos a *Meloidogyne incognita*.

Objetivou-se neste trabalho comparar o efeito na mobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* de sobrenadante bacteriano bruto, liofilizado e liofilizado seguido do tratamento químico para eliminação de aminoácidos. Setenta e um isolados de rizobactérias e bactérias endofíticas foram cultivados em meio líquido “tryptic soy broth” e, após remoção das células bacterianas, o sobrenadante foi colocado em três frascos. Em dois frascos foi realizada a liofilização, e o terceiro frasco foi mantido na forma bruta. Após a liofilização, em um dos frascos foi feita a extração de aminoácidos com diclorometano e, em seguida, a solução foi concentrada em evaporador rotatório até total remoção do solvente orgânico. O resíduo foi solubilizado com 2 mL de solução de Tween 80 a 1%, obtendo-se, desta forma, a amostra do sobrenadante bacteriano liofilizado e sem aminoácidos. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As avaliações foram feitas após 48 h para mobilidade e mortalidade dos J2. Durante o processo de liofilização ocorreu perda da atividade nematocida, na maioria dos isolados, que acarretou uma menor mortalidade e maior mobilidade dos J2 quando comparados com o sobrenadante bacteriano bruto. Verificou-se, também, que a retirada de aminoácidos reduziu a atividade nematocida e/ou nematostática desses isolados, indicando que estas substâncias constituíam princípio ativo.

Palavras – chave: Nematóide de Galhas. Bactérias endofíticas. Rizobactérias.

Summary – Pinho, R. S. C., Campos, V. P., Oliveira, D. F., Rocha, S. F., Souza, R. M., Silva, J. R. C. 2010. Effect of lyophilization and selective dissolution in bacterial metabolites activity toxic to *Meloidogyne incognita*.

The objective of this work was to compare the effect on mobility and mortality of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita* crude bacterial filtrate, lyophilized and lyophilized followed by chemical treatment for removal of amino acids. Seventy-one isolates of rhizobacteria and endophytic bacteria were cultured in liquid medium “tryptic soy broth” and, after removal of bacterial cells, the filtrate of each isolate was placed in three vials. The lyophilization was performed on only two of them. After lyophilization the amino acids were extracted with dichloromethane in one of the flasks, and then the solution was concentrated in a rotary evaporator until complete removal of the organic solvent. The residue was dissolved in 2 mL of 1% Tween 80, thereby obtaining a sample of the lyophilized bacterial filtrate without amino acids. The experiment was organized in a randomized design with four replicates. The assessments of mobility and mortality were made after 48 h. During the lyophilization loss of nematocidal activity occurred in most of the isolates, leading to a lower mortality and greater mobility of J2 when compared with the crude bacterial filtrate. The withdrawal of amino acids reduced the nematocidal and /or nematostatic activity of the isolates, even greater indicating that these substances are active ingredients of the bacterial cultures antagonistic to *M. incognita*.

Keyword: Root-Knot. Endophytic Bacteria. Rhizobacteria.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de rizobactérias e bactérias endofíticas em meio de cultura artificial resulta na alteração de sua composição devido aos metabólitos produzidos pelas bactérias, além de substâncias semidegradadas principalmente cadeias peptídicas não utilizadas por elas. Esses peptídeos, além de carboidratos, podem ser tóxicos aos fitonematoídes. Além disto, componentes do meio semidegradados, quando tóxicos aos J2 de *Meloidogyne* spp, dificultam a detecção dos metabólitos produzidos internamente pela célula bacteriana e excretados no meio. Como o meio para crescimento bacteriano tem na sua composição cadeias peptídicas a sua eliminação poderia melhorar a detecção de metabólitos bacterianos produzidos internamente pelas suas células.

Quando se pensa no uso prático de rizobactérias e bactérias endofíticas pelo produtor, o armazenamento dessas bactérias constitui um aspecto essencial para a comercialização. Neste contexto a liofilização pode ser um processo indicado à preservação de inóculo bacteriano para uso no campo. Entretanto, sabe-se que no processo de liofilização são eliminados substâncias voláteis além de poder ocorrer a desnaturação de proteínas, e tais substâncias poderiam estar envolvidas no efeito antagônico do filtrado bruto. Porém, em alguns casos, (OLIVEIRA et al., dados não publicados) a liofilização do filtrado bacteriano manteve por quatro meses a atividade antagônica a *Meloidogyne exigua* do filtrado bacteriano liofilizado.

O processo inicial de seleção de isolados rizobacterianos e endofíticos quanto ao antagonismo à fitonematoídes tem sido realizado *in vitro* e *in vivo* em casa-de-vegetação com filtrado bacteriano bruto (CARNEIRO; SOUZA; BELARMINO, 1998; COIMBRA, 1998; NAVES, CAMPOS; SOUZA, 2004).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho comparar o efeito na mobilidade e mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita* de sobrenadante do

centrifugado bacteriano bruto, liofilizado e liofilizado seguido do tratamento químico para eliminação de aminoácidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos ensaios foram utilizados 44 isolados de bactérias endofíticas e 27 isolados de rizobactérias obtidos em trabalhos anteriores.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*: ovos de *Meloidogyne incognita* foram extraídos de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., cv Kada), mantidas em casa-de-vegetação, através da técnica proposta por Hussey e Barker (1973). As raízes de tomateiro 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 em um béquer, 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 e D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer, 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 os juvenis de segundo estágio (J2) obtidos no terceiro dia. A suspensão de J2 foi calibrada para 1000 J2/mL.

Obtenção dos metabólitos bacterianos: bactérias mantidas em freezer a -80 °C foram cultivadas em placa de Petri contendo meio “Trypic Soy Agar”

(TSA) e incubadas a 28 °C por 48 horas. A seguir, foram repicadas com alça de platina, em câmara de fluxo laminar, para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido “Tryptic Soy Broth” (TSB) que foram mantidos a 28 °C, por 7 dias, sob agitação de 100 rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 minutos, para a remoção das células bacterianas e o sobrenadante de cada cultivo foi distribuído em três frascos de vidro estéreis, tendo sido um mantido como estoque para os experimentos empregando os metabólitos na forma bruta, e dois para a liofilização seguida ou não da solubilização seletiva.

Obtenção dos metabólitos bacterianos liofilizados e liofilizados sem aminoácidos: para as liofilizações das amostras, duas alíquotas 10 mL de cada sobrenadante bacteriano foi congelado a -10 °C em béquer de vidro de 150 mL. Os béqueres com os filtrados foram vedados com papel alumínio e filme de PVC contendo pequenos furos e colocados em liofilizador por 48 horas. A seguir, o resíduo correspondente a uma alíquota de cada sobrenadante bacteriano foi diluído em 10 mL de água destilada e congelado até utilização nos ensaios de mobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita*.

Para eliminar os aminoácidos a partir dos sobrenadantes bacterianos liofilizados, o resíduo correspondente à segunda alíquota de cada sobrenadante bacteriano foi colocado em contato com 15 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). A mistura resultante foi filtrado em algodão hidrófilo e concentrou-se a solução obtida em evaporador rotatório até a total remoção do solvente orgânico. O resíduo da evaporação do diclorometano foi solubilizado com 2 mL de solução de Tween 80 a 1% (v/v), obtendo-se, desta forma, a amostra do sobrenadante bacteriano liofilizado e sem aminoácidos.

Instalação e avaliação dos ensaios: em células de 300 µL de placa de polipropilileno com 96 células, em câmara de fluxo laminar, colocaram-se 100

μL do sobrenadante bacteriano bruto, liofilizado ou liofilizado sem aminoácidos. A seguir, foram pipetados 10 μL de solução de Pentabiótico a 3000 mg/mL e 20 μL de suspensão de J2 previamente calibrada com 20 J2 de *M. incognita*, em cada célula da placa contendo os sobrenadantes bacterianos (não liofilizado, liofilizado e liofilizado sem aminoácidos). As testemunhas foram formadas por solução de Aldicarb 500 mg/mL, meio de cultura TSB, solução de Tween 80 a 1% e água. Cada célula da placa foi individualmente vedada com fita adesiva e a placa colocada em B.O.D. a 28 °C por 48 h. Após esse período, avaliou-se a mobilidade dos J2 pela contagem dos nematoides móveis e imóveis. A avaliação de mortalidade foi realizada conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000), a qual consistiu em adicionar NaOH 1,0 M à suspensão de nematoides. Em seguida, realizou-se a contagem dos J2 mortos e vivos, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis e vivos os móveis ou retorcidos.

Realizaram-se dois ensaios testando-se no 1º ensaio 44 isolados de bactérias endofíticas e no 2º ensaio 27 isolados rizobacterianos, num total de 71 isolados bacterianos.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada célula da placa de polipropileno constituiu uma unidade experimental. A análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974), ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baixa mobilidade e alta mortalidade ocorreram, em geral, no sobrenadante bacteriano bruto, decrescendo de intensidade quando se liofiliza, porém, com redução drástica quando o aminoácido foi eliminado do sobrenadante liofilizado (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Tabela 1 Efeito de metabólitos de bactérias endofíticas na mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição ao sobrenadante bacteriano, sobrenadante liofilizado e sobrenadante liofilizado e sem aminoácidos.

Tratamentos	Sobrenadante	Sobrenadante liofilizado	Sobrenadante sem aminoácidos	J2 móveis (%)			
Água	97,7 e	97,7 e	97,7 g				
Água + pentabiótico	95,7 e	95,7 e	95,7 g				
TSB	94,0 e	94,0 e	94,0 g				
Tween 80	-	-	97,7 g				
Aldicarbe 500 ppm	0,0 a	0,0 a	0,0 a				
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1JC)	0,0 a	0,0 a	77,2 d				
2 JC	0,0 a	18,7 c	73,7 d				
4 JC	55,2 c	50,7 d	59,7 b				
<i>Bacillus cereus</i> (6 JC)	3,2 a	0,0 a	60,7 b				
<i>A. johnsonii</i> (9 JC)	33,7 b	19,7 c	57,2 b				
<i>A. johnsonii</i> (10 JC)	0,0 a	13,0 b	95,0 g				
11 JC	0,0 a	11,7 b	82,0 e				
<i>B. cereus</i> (13JC)	0,0 a	13,2 b	96,0 g				
<i>Curtobacterium luteum</i> (16 JC)	3,5 a	0,0 a	95,5 g				
<i>Staphylococcus aureus</i> (18 JC)	6,5 a	13,5 b	94,2 g				
<i>B. subtilis</i> (19 JC)	0,0 a	4,2 a	76,5 d				
<i>B. pumilus</i> (20 JC)	0,0 a	6,0 a	65,7 c				
<i>B. amyloliquefaciens</i> (21 JC)	0,0 a	24,2 c	59,7 b				
<i>B. amyloliquefaciens</i> (22 JC)	0,0 a	14,0 b	62,5 c				
23 JC	52,0 c	48,2 d	55,0 b				
<i>B. pumilus</i> (26 JC)	0,0 a	24,2 c	86,0 f				
<i>Bacillus pumilus</i> subg. <i>B.</i> (27JC)	0,0 a	50,7 d	81,5 e				
<i>B. amyloliquefaciens</i> (28 JC)	0,0 a	6,2 a	74,5 d				

...continua...

Tabela 1, cont.

30 JC	0,0 a	13,2 b	74,7 d
<i>B. subtilis</i> (31 JC)	1,0 a	22,2 c	95,7 g
34 JC	0,0 a	24,5 c	73,5 d
35 JC	85,0 d	0,0 a	88,0 f
<i>B. amyloliquefaciens</i> (36 JC)	0,0 a	3,0 a	52,7 b
<i>Paenibacillus gordonae</i> (37JC)	0,0 a	20,7 c	81,2 e
38 JC	0,0 a	12,5 b	80,7 e
<i>B. pumilus</i> (39 JC)	0,0 a	2,2 a	58,2 b
<i>Paenibacillus gordonae</i> (40JC)	0,0 a	23,2 c	76,5 d
<i>B. amyloliquefaciens</i> (41 JC)	0,0 a	50,5 d	83,0 e
<i>B. sphaericus</i> (43 JC)	0,0 a	0,0 a	95,5 g
<i>B. marinus</i> (44 JC)	2,0 a	0,0 a	82,7 e
<i>B. sphaericus</i> (45 JC)	2,0 a	4,0 a	67,2 c
<i>P. macerans</i> (47 JC)	0,0 a	9,5 a	76,2 d
<i>B. pumilus</i> (48 JC)	0,0 a	2,0 a	68,2 c
<i>B. pumilus</i> (49 JC)	0,0 a	9,5 a	79,2 e
<i>B. amyloliquefaciens</i> (50 JC)	0,0 a	4,7 a	49,5 b
<i>B. pumilus</i> (52 JC)	0,0 a	0,0 a	56,2 b
<i>B. sphaericus</i> (53 JC)	0,0 a	5,0 a	76,5 d
<i>B. sphaericus</i> (54 JC)	0,0 a	0,0 a	89,2 f
1 R	0,0 a	0,7 a	66,7 c
35 R	0,0 a	0,0 a	64,7 c
57 R	0,0 a	0,0 a	86,5 f
59 R	0,0 a	2,2 a	91,5 f
69 R	0,0 a	0,0 a	89,2 f
78 R	0,0 a	0,0 a	92,0 f

Testemunhas: J2 armazenados em água, meio líquido TSB, Aldicarb 500 mg/L e em solução de Tween 1%. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Tabela 2 Efeito de metabólitos de bactérias endofíticas na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição ao sobrenadante bacteriano, sobrenadante liofilizado e sobrenadante liofilizado e sem aminoácidos.

Tratamentos	Mortalidade (%)		
	Sobrenadante	Sobrenadante liofilizado	Sobrenadante sem aminoácidos
Água	2,2 a	0,0 a	0,0 a
Água + pentabiótico	4,2 a	1,2 a	1,5 a
TSB	6,0 a	7,5 a	7,5 a
Tween 80	-	-	0,0 a
Aldicarbe 500 ppm	100,0 e	100,0 f	100,0 d
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (1JC)	100,0 e	93,7 f	6,2 a
2 JC	100,0 e	87,2 f	2,0 a
4 JC	44,7 c	50,7 c	11,2 b
<i>Bacillus cereus</i> (6 JC)	97,0 e	100,0 f	23,0 c
<i>A. johnsonii</i> (9 JC)	69,2 d	24,0 b	16,0 b
<i>A. johnsonii</i> (10 JC)	100,0 e	68,0 d	0,0 a
11 JC	100,0 e	68,7 d	1,0 a
<i>B. cereus</i> (13JC)	100,0 e	37,0 c	0,0 a
<i>Curtobacterium luteum</i> (16JC)	96,7 e	81,2 e	0,0 a
<i>Staphylococcus aureus</i> (18 JC)	93,7 e	47,5 c	0,0 a
<i>B. subtilis</i> (19 JC)	100,0 e	30,2 b	15,2 b
<i>B. pumilus</i> (20 JC)	100,0 e	97,0 f	16,7 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (21 JC)	100,0 e	97,0 f	14,7 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> (22 JC)	100,0 e	92,5 f	21,0 c
23 JC	74,0 d	59,2 d	21,7 c
<i>B. pumilus</i> (26 JC)	100,0 e	21,7 b	0,0 a
<i>Bacillus pumilus</i> subg. <i>B</i> (27JC)	93,5 e	23,7 b	4,0 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (28 JC)	100,0 e	15,2 b	0,0 a
30 JC	99,0 e	47,2 c	0,0 a
<i>B. subtilis</i> (31 JC)	100,0 e	21,5 b	0,0 a
<i>Microbacterium liquefaciens</i> (34 JC)	100,0 e	74,2 e	1,0 a
35 JC	15,2 b	100,0 f	0,0 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (36 JC)	100,0 e	97,0 f	12,7 b
<i>Paenibacillus gordonae</i> (37JC)	100,0 e	44,2 c	4,7 a
38 JC	100,0 e	71,2 e	2,5 a
<i>B. pumilus</i> (39 JC)	100,0 e	97,7 f	25,2 c
<i>Paenibacillus gordonae</i> (40JC)	100,0 e	26,2 b	4,2 a

...continua...

Tabela 2, cont.

<i>B. amyloliquefaciens</i> (41 JC)	100,0 e	15,7 b	1,7 a
<i>B. sphaericus</i> (43 JC)	100,0 e	100,0 f	0,0 a
<i>B. marinus</i> (44 JC)	98,0 e	3,2 a	0,0 a
<i>B. sphaericus</i> (45 JC)	98,0 e	20,0 b	0,0 a
<i>P. macerans</i> (47 JC)	100,0 e	76,7 e	4,0 a
<i>B. pumilus</i> (48 JC)	100,0 e	26,7 b	15,0 b
<i>B. pumilus</i> (49 JC)	100,0 e	22,0 b	0,0 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> (50 JC)	100,0 e	92,0 f	17,6 b
<i>B. pumilus</i> (52 JC)	100,0 e	27,0 b	13,7 b
<i>B. sphaericus</i> (53 JC)	100,0 e	77,5 e	1,2 a
<i>B. sphaericus</i> (54 JC)	100,0 e	89,2 f	0,0 a
1 R	100,0 e	11,7 a	0,0 a
35 R	100,0 e	97,7 f	18,0 b
57 R	100,0 e	100,0 f	0,0 a
59 R	100,0 e	21,0 b	0,0 a
69 R	100,0 e	97,5 f	4,0 a
78 R	100,0 e	73,7 e	0,0 a

Testemunhas: J2 armazenados em água, meio líquido TSB, Aldicarb 500 mg/L e em solução de Tween 1%. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Tabela 3 Efeito de metabólitos de rizobactérias na mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição ao sobrenadante bacteriano, sobrenadante liofilizado e sobrenadante liofilizado e sem aminoácidos.

Tratamentos	Sobrenadante	Sobrenadante liofilizado	Sobrenadante sem aminoácidos
	Mobilidade (%)		
Água	97,7 f	97,7 f	97,7 g
Água + pentabiótico	95,7 f	95,7 f	95,7 g
TSB	94,0 f	94,0 f	94,0 g
Tween 80	-	-	97,7 g
Aldicarbe 500 ppm	0,0 a	0,0 a	0,0 a
6 J	0,0 a	52,2 d	88,5 g
10 J	1,7 a	0,0 a	53,0 d
34 J	0,0 a	12,5 a	81,2 f
35 J	3,2 a	0,0 a	63,5 e
48 J	0,0 a	47,2 d	83,2 f
102 J	0,0 a	0,0 a	56,2 e
132 J	0,0 a	0,0 a	60,2 e
137 J	0,0 a	5,2 a	91,2 g
146 J	14,0 b	4,2 a	72,5 f
154 J	0,0 a	8,7 a	64,7 e
JE 1607	13,0 b	0,0 a	55,2 e
JE 1708	87,0 e	69,5 e	49,5 d
JE 1803	0,0 a	1,2 a	85,2 g
JE 1805	0,0 a	38,2 c	97,5 g
JE 1807	50,2 c	9,0 a	14,7 b
JE 2001	0,0 a	21,2 b	60,7 e
JE 2005	0,0 a	6,7 a	43,7 d
JE 2006	0,0 a	6,2 a	66,5 e
JE 2007	0,0 a	20,7 b	78,5 f
JE 2009	0,0 a	6,2 a	61,7 e
JE 2010	0,0 a	13,0 a	60,0 e
JE 2011	0,0 a	37,2 c	57,5 e
JE 2012	0,0 a	30,0 c	40,5 d
JE 2201	0,0 a	5,2 a	66,7 e
JE 2202	7,7 b	0,0 a	72,7 f
JE 2205	62,7 d	0,0 a	69,0 f
JE 2210	1,7 a	0,0 a	31,7 c

Testemunhas: J2 armazenados em água, meio líquido TSB, Aldicarb 500 mg/L e em solução de Tween 1%. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Tabela 4 Efeito de metabólitos de rizobactérias na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, após 48 horas de exposição ao sobrenadante bacteriano, sobrenadante liofilizado e sobrenadante liofilizado e sem aminoácidos.

Tratamentos	Sobrenadante	Sobrenadante liofilizado	Sobrenadante sem aminoácidos
	Mortalidade (%)		
Água	2,2 a	0,0 a	0,0 a
Água + pentabiótico	4,2 a	1,5 a	1,5 a
TSB	6,0 a	7,5 a	7,5 a
Tween 80	-	-	0,0 a
Aldicarb 500 ppm	100,0 f	100,0 h	100,0 e
6 J	100,0 f	12,0 b	3,7 a
10 J	98,2 f	100,0 h	1,7 a
34 J	100,0 f	23,0 c	0,0 a
35 J	96,7 f	75,0 f	15,0 b
48 J	100,0 f	13,7 b	21,2 c
102 J	100,0 f	64,2 e	23,7 c
132 J	100,0 f	88,2 g	20,7 c
137 J	100,0 f	67,2 e	0,0 a
146 J	86,0 e	76,0 f	1,5 a
154 J	100,0 f	64,2 e	15,0 b
JE 1607	87,0 e	100,0 h	16,2 b
JE 1708	13,2 b	30,5 c	18,7 b
JE 1803	100,0 f	86,5 g	0,0 a
JE 1805	100,0 f	18,7 b	0,0 a
JE 1807	49,8 d	82,2 g	0,0 a
JE 2001	100,0 f	90,0 g	0,0 a
JE 2005	100,0 f	88,7 g	19,7 c
JE 2006	100,0 f	77,0 f	0,0 a
JE 2007	100,0 f	32,5 c	0,0 a
JE 2009	100,0 f	46,7 d	4,2 a
JE 2010	100,0 f	61,2 e	0,0 a
JE 2011	100,0 f	23,2 c	0,0 a
JE 2012	100,0 f	60,0 e	30,7 c
JE 2201	100,0 f	94,7 h	25,0 d
JE 2202	92,2 f	100,0 h	5,0 a
JE 2205	37,0 c	100,0 g	11,7 b
JE 2210	98,2 f	100,0 g	22,2 c

Testemunhas: J2 armazenados em água, meio líquido TSB, Aldicarb 500 mg/L e em solução de Tween 1%. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Na maioria dos filtrados rizobacterianos e endofíticos testados, ocorreu redução da mortalidade do J2 com a liofilização. Entretanto, os sobrenadantes dos isolados 35 JC, JE 1607, JE 1708, JE 1807 e JE 2205, quando liofilizados aumentaram a porcentagem de mortalidade (Tabelas 2 e 4).

A mobilidade de J2 aumentou quando os sobrenadantes rizobacterianos e endofíticos foram liofilizados e liofilizados com a retirada dos aminoácidos (Tabelas 1 e 3). Entretanto, os sobrenadantes dos isolados 146 J, JE 1607, JE 1708, JE 1807, JE 2202, JE 2205, 35 JC apresentaram menor mobilidade dos J2 quando foram liofilizados, em relação ao sobrenadante bruto.

Os isolados 4 JC e 23 JC apresentaram mobilidade semelhante para as três formas avaliadas, indicando que não houve perda de substâncias nematostáticas durante o processo de liofilização e extração de aminoácidos (Tabela 1).

Mais de 90% dos sobrenadantes brutos causaram mais de 50% de mortalidade de J2. Nos sobrenadantes liofilizados esta mortalidade maior que 50% ocorreu em 60% dos isolados testados. Quando foi realizada a solubilização seletiva com vista à obtenção de sobrenadantes isentos de aminoácidos, todos os isolados apresentaram mortalidade inferior a 30% (Figura 1). Naves et al. (2004) encontraram 52,5% dos isolados em filtrado bruto testados com mais de 50% de mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*. Zavaleta-Mejia e Van Gundy (1982) obtiveram 12% dos isolados bacterianos testados com atividade antagônica ao nematoide de galhas.

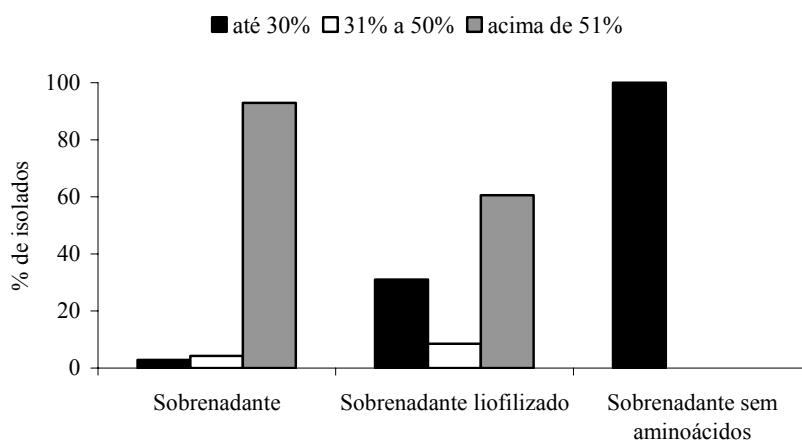


Figura 1 Frequência de classes de isolados com mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*: a) até 30%, b) entre 31 e 50% e c) acima de 51%.

Ao que tudo indica, durante este processo de liofilização, ocorreram perdas de substâncias em quantidade e/ou qualidade, que explicaria a redução da mortalidade dos J2 quando as amostras foram apenas liofilizadas. Ali et al. (2002), trabalhando com isolados de *Pseudomonas* spp. verificaram a sensibilidade dos compostos nematicidas, presentes nos filtrados bacterianos, ao processo de liofilização, tratamento a quente ou extremos de pH.

Oka et al. (1993), trabalhando com filtrados de *Bacillus cereus* observaram perda da atividade nematicida quando esses filtrados foram submetidos à redução de pH, fervura ou diálise, sugerindo a possibilidade de que um ingrediente ativo da cultura tenha sido amônia, liberada durante o processo de degradação de peptídeos no meio pela atividade bacteriana.

Com exceção do isolado 48 J, para todos os isolados rizobacterianos e endofíticos ocorreram reduções da mortalidade do J2 com a extração dos aminoácidos (Tabelas 2 e 4). Isto sugere que as substâncias ativas produzidas pelos isolados rizobacterianos e endofíticos seriam aminoácidos. Oliveira et al.

(2009) purificaram substâncias ativas contra *M. exigua* produzidas pela bactéria *Paenibacillus macerans*. Esses autores verificaram que substâncias nematicidas produzidas por essa bactéria eram os aminoácidos treonina, glicina, alanina, valina, histidina, metionina, isoleucina e leucina. Esses aminoácidos foram testados contra J2 de *M. exigua*, que permitiu confirmar suas atividades nematicidas. Barbosa et al. (1999) verificaram a atividade de L-3,4-diidroxifenilalanina contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. Osman (1993) observou a atividade de L-arginina e de ácido L-glutâmico contra *Meloidogyne javanica*. Talavera e Mizukubo (2005) verificaram a atividade de DL-metionina contra *M. incognita*. Ali et al. (2002), trabalhando com isolados de *Pseudomonas* spp., verificaram que os metabólitos responsáveis pela atividade nematicida foram glicoproteínas e proteínas. Siddiqui et al. (2000) encontraram substâncias polares como princípio ativo de *Pseudomonas aeruginosa*.

Portanto, durante o processo de liofilização ocorreu perda da atividade nematicida, que acarretou uma menor mortalidade dos juvenis do segundo estágio quando comparado com o sobrenadante bacteriano bruto. Verificou-se, também, que a solubilização seletiva para a retirada de aminoácidos, reduziu a atividade nematicida e/ou nematostática, indicando que estas substâncias constituem o princípio ativo.

LITERATURAS CITADAS

- ALI, N. I. et al. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 8, p. 1051-1058, Aug. 2002.
- BARBOSA, L. C. A. et al. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Nematropica**, Bradenton, v. 29, n. 1, p. 81-88, June 1999.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; SOUZA, I. S.; BELARMINO, L. C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strain on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 12-21, abr./jun. 1998.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology** v.32, n.1, p.117-121, Jan. 2000.
- COIMBRA, J. L. **Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp.** 1998. 76 p. Dissertação (Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.
- 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.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p.1025-1028, Dec. 1973.
- 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.
- OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 115-126, Feb. 1993.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-Knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, Nov. 2009.

OSMAN, G. Y. Effect of amino-acids and ascorbic acid on *Meloidogyne javanica* Chitw. (Tylenchidae, Nematoda). **Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, Berlin, v. 66, n. 7, p. 140-142, Oct. 1993.

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

SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot-root knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterranea**, Bologna, v. 28, n. 2, p. 189-192, Dec. 2000b.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 4, p. 413-416, Apr. 2005.

ZAVALETA-MEJIA, E.; VAN GUNDY, S. D. Effects of rizobacteria on *Meloidogyne* infection. **Journal of Nematology**, v. 14, n.4, p. 475-476, Apr. 1982.