

RIZOBACTÉRIAS ANTAGONISTAS A
Meloidogyne javanica, ISOLAMENTO E
PARASITISMO DE FUNGOS DE FÊMEAS DE
Meloidogyne spp.

JOÃO LUIZ COIMBRA

1998

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

IN THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

REPORT OF THE RESEARCH GROUP

ON THE CHEMISTRY OF THE CARBON DIOXIDE SYSTEM

BY THE RESEARCH GROUP

OF THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

IN THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

ON THE CHEMISTRY OF THE CARBON DIOXIDE SYSTEM

BY THE RESEARCH GROUP

OF THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

IN THE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

ON THE CHEMISTRY OF THE CARBON DIOXIDE SYSTEM

44656

MTN30868

JOÃO LUIZ COIMBRA

**RIZOBACTÉRIAS ANTAGONISTAS A *Meloidogyne javanica*,
ISOLAMENTO E PARASITISMO DE FUNGOS DE FÊMEAS DE
Meloidogyne spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1998

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

Coimbra, João Luiz

Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. / João Luiz Coimbra. –
Lavras : UFLA, 1998.

76 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Rizobactéria. 2. Isolamento. 3. Controle. 4. *Meloidogyne javanica*. 5. Fungo. 6. Fêmea. 7. *Meloidogyne exigua*. 8. Parasitismo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.95

-632.4

JOÃO LUIZ COIMBRA

**RIZOBACTÉRIAS ANTAGONISTAS A *Meloidogyne javanica*,
ISOLAMENTO E PARASITISMO DE FUNGOS DE FÊMEAS DE
Meloidogyne spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 24 de setembro de 1998

Prof. Ricardo Magela de Souza **UFLA**

Prof. Romildo da Silva **UFLA**


Prof. Vicente Paulo Campos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A
Deus,
pela dádiva da
vida

Aos meus pais, Antonio e Marcia
pelo carinho e confiança depositados
em mim

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força por mais esta conquista.

A Universidade Federal de Lavras pela boa formação profissional e a oportunidade de realização desse curso.

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

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq, pela concessão de bolsa durante o curso.

Ao Professor Vicente Paulo Campos pela orientação.

Ao Cleber Maximiliano pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Ao Tarley e a Ana pela grande ajuda na condução dos experimentos.

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

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

A Cida, pelo carinho, compreensão e paciência nos momentos difíceis.

Aos colegas de curso Benardo, Katia, Alessandra, Claudine, Luciana, Cristian, Eneida e demais colegas do Departamento Fitopatologia.

Um sincero muito obrigado !

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	v
CAPÍTULO 1: Rizobactérias antagonistas a <i>Meloidogyne javanica</i>, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp	vi
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 Introdução Geral	1
2 Revisão de Literatura	3
2.1 Associação e antagonismo de nematóides e bactérias	4
2.2 Associação e antagonismo de nematóides com bactérias da rizosfera	6
2.2.1 Métodos de isolamento de rizobactérias	11
2.2.2 Modo de ação das rizobactérias na redução populacional de nematóides.	12
2.2.3 Perspectivas das pesquisas com rizobactérias no controle de fitonematóides e possível uso no campo.	13
2.3 Fungos da rizosfera associados a fêmeas de nematóides	14
3 Metodologia Geral	18
4 Literatura citada	20
CAPÍTULO 2: Rizobactérias antagonistas a <i>Meloidogyne javanica</i>	30
Resumo	30
Abstract	31
1 Introdução	32
2 Metodologia	33
3 Resultados e Discussão	38
4 Conclusões	55
5 Literatura citada	56
6 Anexos	59
CAPÍTULO 3: Isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>M. exigua</i>	62
Resumo	62
Abstract	63
1 Introdução	64
2 Metodologia	66
3 Resultados e Discussão	69
4 Conclusões	73
5 Literatura citada	74

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Locais de coleta e os hospedeiros amostrados	33
TABELA 2 - Isolados bacterianos e as respectivas plantas hospedeiras	39
TABELA 3 - Isolados bacterianos com as respectivas rizosferas e os locais de coleta avaliados no primeiro experimento.	40
TABELA 4 - Efeito de isolados bacterianos da rizosfera do primeiro experimento no número de galhas e ovos por grama de raiz, e no peso em gramas (g) da matéria seca da parte aérea do tomateiro	41
TABELA 5 - Isolados bacterianos com as respectivas rizosferas e os locais de coleta avaliados no segundo experimento.	44
TABELA 6 - Efeito de isolados bacterianos da rizosfera do segundo experimento no número de galhas e ovos por grama de raiz, e no peso em gramas (g) da matéria seca da parte aérea do tomateiro.	45
TABELA 7 - Seleção dos melhores isolados com efeito significativo na redução de galhas por gramas de raiz, ovos por grama de raiz ou no aumento da matéria seca da parte aérea do tomateiro quando comparados com a testemunha.	50
TABELA 8 - Procedência das amostras empregadas no isolamento de fungos de fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp.	66
TABELA 9 - Fungos isolados externa e internamente de fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp ..	70

CAPÍTULO 1

RIZOBACTÉRIAS ANTAGONISTAS A *Meloidogyne javanica*, ISOLAMENTO E PARASITISMO DE FUNGOS DE FÊMEAS DE *Meloidogyne* spp.

RESUMO

COIMBRA, João Luiz. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 1998. 76p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) *

Foram obtidos 130 isolados bacterianos a partir da rizosfera das seguintes espécies de plantas: tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), lablab (*Dolichos lablab* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), capuchinha (*Trapaecolum majus* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.), coletadas na região rural dos municípios de Lavras (MG), Ijaci (MG) e Ribeirão Vermelho (MG). Os isolados obtidos foram testados no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro, através de dois experimentos montados em duas épocas diferentes na casa de vegetação. Para montagem dos experimentos, plantas de tomate tiveram suas raízes bacterizadas e em seguida, transplantadas para bandejas de tubetes contendo substrato Plantmax onde foi feita a inoculação com ovos de *Meloidogyne javanica* e 30 dias após realizou-se a avaliação dos experimentos. Cinquenta e três isolados (40,76%) demonstraram antagonismo ao nematóide; desses, 32 isolados reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro através da redução do número de galhas e 47 isolados reduziram o número de ovos. Dos isolados que reduziram o número de galhas, o maior número deles veio de alface e de tomate coletados na região de Ijaci.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos - UFLA (Orientador) - Ricardo Magela de Souza - UFLA, Romildo da Silva - UFLA.

Trinta isolados fúngicos foram obtidos externa e internamente ao corpo de fêmeas de *Meloidogyne* sp e identificados como: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Verticillium* sp. e *Curvularia* sp.. O gênero *Fusarium* foi o que mais predominou entre os isolados, sendo as espécies *F. solani* e *F. oxysporum* as mais freqüentes. Testes “in vitro “ foram realizados para observação do parasitismo dos fungos *P. lilacinus* (4 isolados), *P. variotii* (1 isolado), *Aspergillus ochraceus* (1 isolado), *Penicillium* sp. (1 isolado), *Verticillium* sp. (1 isolado), *F. oxysporum* (3 isolados) e *Fusarium* sp. (8 isolados), em fêmeas de *Meloidogyne javanica*. Todos os isolados demonstraram alta capacidade de parasitismo de fêmeas em *Meloidogyne javanica*, “in vitro”.

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos - UFLA (Orientador) - Ricardo Magela de Souza - UFLA, Romildo da Silva - UFLA.

ABSTRACT

COIMBRA, João Luiz. Antagonistic rhizobacteria to *Meloidogyne javanica*, isolation and parasitism of *Meloidogyne* spp. female fungi. Lavras: UFLA, 76p. (Dissertation – Master Program in Phytopathology) *

A hundred thirty bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill), okra (*Hibiscus esculentus*), coffee (*Coffea arabica*), bean (*Phaseolus vulgaris*), pepper (*Capsicum annuum* L.), Lablab (*Dolichos lablab*), castor bean (*Ricinus communis*), marigold (*Tagetes erecta* L.), “capuchinha” (*Trapaeolum majus*) and lettuce (*Lactuca sativa* L.), collected from Lavras, Ijaci and Ribeirão Vermelho counties of Minas Gerais state, Brazil. Two screening experiments were done by inoculating tomato seedlings with the bacterial isolates in greenhouse followed by *Meloidogyne javanica* eggs inoculation. Thirty days later were avaliated the number of eggs per tomato plant, number of galls per plant and shoot dry weight. Fifty three isolates (40,76%) demonstrate antagonistic effect in nematode. Thirty two isolates reduced the number of galls per plant and fourty seven isolates reduced the number of eggs per plant. Isolates from lettuce and tomato were the most frequent in reducing galls per plant, but at least, a few isolates from each plant sampled had the same effect. Thirty fungal isolates were obtained from internal and external *Meloidogyne* sp. females bodies, and identified, as: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Verticillium* sp. and *Curvularia* sp. Among the isolates *Fusarium*, *F. solani* and *F. oxysporum* were the most frequent genus and species, respectively. “In vitro” parasitism tests were done using *P. lilacinus* (4 isolates), *Aspergillus ochraceus* (1 isolate), *Penicillium* sp. (1 isolate), *Verticillium* sp. (1 isolate), *F. oxysporum* (3 isolates) and *Fusarium* sp. (8 isolates) inoculated on *Meloidogyne javanica* female bodies. All fungus isolates parasitized *M. javanica* females.

* Guidance Commitee: Vicente Paulo Campos (Major Professor), Ricardo Magela de Souza – UFLA and Romildo da Silva – UFLA

1 INTRODUÇÃO GERAL

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

As bactérias da rizosfera constituem um grupo muito diversificado e abundante. Estima-se que 1 g de solo tenha entre 10^6 a 10^9 bactérias com funções diferenciadas (Siqueira, 1988). Existem bactérias na rizosfera que são antagonistas de nematóides. O grupo mais estudado é o da *Pasteuria* spp. (Campos, Souza e Souza, 1998). Entretanto, outras bactérias que crescem em meio de cultura também afetam o desenvolvimento do nematóide e diminuem sua população no seu nicho ecológico (Campos, Souza e Souza, 1998). Esse grupo é caracterizado como rizobactérias, isto é, bactérias de natureza saprofítica que colonizam as raízes das plantas (Campos, Souza e Souza, 1998). Muitas espécies do gênero *Bacillus*, além de *Pseudomonas fluorescens* afetam a eclosão de juvenis através de substâncias produzidas em meio de cultura (Prasad, Tilak e Gollakota, 1972). Também as espécies de *Clostridium*, *Desulfovibrio* e *Chromobacterium* tem efeito semelhante a *Bacillus* e *Pseudomonas* (Fortuner e Jacq ; 1976 e Johnston, 1959; Wilt e Smith, 1970).

As fêmeas de *Meloidogyne*, mesmo desenvolvendo-se dentro da raiz podem ser infectadas por fungos e bactérias (Sayre, 1985), entretanto pouco se conhece a respeito dos patógenos desse nematóide.

Desta forma, objetivou-se nesse trabalho:

- 1 - Isolar bactérias da rizosfera de várias espécies de plantas;
- 2 - Selecionar isolados de rizobactérias que conferem proteção ao sistema radicular;
- 3- Isolar e identificar fungos associados a fêmeas de *Meloidogyne* spp.; e
- 4- Testar “in vitro”, o parasitismo de fungos isolados em fêmeas de *Meloidogyne javanica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A adubação concentrada na rizosfera de plantas de interesse econômico cria condições para determinados microorganismos ~~que~~ se estabelecerem nessa região. Porém mesmo na natureza, muitos microorganismos desenvolvem-se na rizosfera das plantas como por exemplo, os antagonistas de fitonematóides utilizando-se talvez, de substâncias secretadas pelas raízes na forma de exudatos radiculares (Pramer, 1964). Esses exudatos contêm nutrientes essenciais e fatores de crescimento em concentrações variáveis para os microorganismos. São constituídos basicamente de amino-ácidos, açúcares, glicosídeos, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, alcalóides, nucleotídeos e íons inorgânicos (Schroth, Loper e Hildebrand, 1984). Desta forma, a rizosfera torna-se uma região rica para o crescimento de microorganismo, com uma área de influência de alguns milímetros em torno das raízes (Cardoso e Freitas, 1992).

Hiltner (1904), define rizosfera como área do solo sob a influência das raízes das plantas.

As associações constantes entre organismos que habitam a rizosfera, têm forte impacto sobre o estabelecimento de nematóide, resultando num balanço biológico entre eles manifestado pela sua redução populacional devido ao parasitismo e infecções por organismos da rizosfera nas diversas fases do ciclo de vida do nematóide (Naves e Campos, 1991; Ribeiro e Campos, 1993; Campos e Campos, 1997; Angieri Filho e Campos, 1997; Souza e Campos, 1997). Massas de ovos, fêmeas ou cistos podem ser diretamente invadidos por organismos patogênicos ou oportunistas, atraídos por nutrientes da massa mucilagínosa ou por substâncias do corpo das fêmeas de alguns nematóides. Também indiretamente podem sofrer efeito das toxinas ou metabólitos diferentes

produzidos por um ou mais microorganismos com efeito nos diferentes estágios de desenvolvimento do nematóide (Jatala, 1986).

Microorganismos que crescem na rizosfera das plantas, são ideais como agentes do controle biológico, pois a rizosfera estabelece uma linha de defesa contra a ação de patógenos (Weller, 1988). Para sua melhor utilização precisa-se conhecer melhor os organismos da rizosfera que são antagonistas aos fitonematóides bem como o potencial deles no controle de patógenos de plantas.

2.1 Associação e antagonismo de nematóides e bactérias

Nematóides e bactérias, convivem em um mesmo habitat no solo, apresentando grande diversidade de espécies e além de existirem em abundância. Nos últimos milhões de anos ocorreu grande evolução, estabelecimento de formas complexa de interação entre eles e o desenvolvimento de formas diversas de parasitismo (Sayre, 1980).

Tem-se observado, a ocorrência de bactérias na cavidade do corpo e gônadas de alguns nematóides, sendo essas observações bem documentadas por Dollfus (1946) e relatados por Jatala (1986). Adams e Eichmuller (1963), relataram uma associação entre a bactéria *Pseudomonas denitrificans* e o nematóide *Xiphinema americanum*. A bactéria foi encontrada em todo o corpo dos juvenis e em fêmeas adultas do nematóide, mas se concentrava no intestino e ovários, sugerindo transmissão transovariana. Mankau (1981), observou o que pareceu ser bactérias simbiotes nos ovários dos nematóides *Trichodorus* sp., *Xiphinema americanum* Cobb e *Xiphinema silvaticum*. Entretanto precisa-se distinguir entre as bactérias parasitas de nematóides e as oportunistas.

Bactérias anaeróbias que obtêm sua fonte de energia através da redução de sulfato em sulfeto, já demonstraram efeitos tóxicos a nematóides.

Desulfovibrio desulfuricans, é um gênero de bactéria anaeróbia redutora de sulfato com propriedades tóxicas a nematóides (Rodrigues-Kabana, Jordan e Hollis, 1965). Estudos no Senegal, demonstraram que o sulfeto solúvel, causou a mortalidade dos nematóides *Hirschmanniella oryzae*, *H. spinicaudata* e *Tylenchorhynchus mashhoodi*, cuja dosagem letal foi a mesma para as três espécies (Fortuner e Jacq, 1976). Grande redução populacional do nematóide *Hirschmanniella oryzae* em arroz ocorreu pela bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans*. Substâncias tóxicas a *Tylenchorhynchus martini* tem sido produzidas pela bactéria *Clostridium butyricum* em solos saturados de umidade (Johnston, 1959). Hollis e Rodrigues-Kabana (1966 e 1967), relataram fortes evidências da produção de ácido butírico em concentrações nematicidas em condições de anaerobiose no solo com efeito tóxico sobre nematóides. Bactérias do gênero *Chromobacterium*, produzem amônia e cianeto, que são potentes nematicidas (Wilt e Smith, 1970).

Bactérias do gênero *Enterobacter* produzem substâncias nematicidas. Lizuka et al. (1962), demonstraram que os filtrados de cultura de nove isolados testados desse gênero apresentaram alta a moderada atividade nematicida.

Entre os antagonistas bacterianos mais estudados e eficientes no parasitismo de nematóides, estão o grupo *Pasteuria* spp. (Campos, Souza e Souza, 1998 e Tribe, 1980). *Pasteuria* sp. é um parasita obrigatório, de alta especificidade aos seus hospedeiros. Constitui um dos organismos mais promissores no controle biológico de nematóides por apresentar alta resistência dos seus esporos à dessecação, eficientes mecanismos de fixação e penetração no hospedeiro, além de bloquear a produção de ovos nos nematóides (Campos, Souza e Souza, 1998 e Stirling, 1984). Porém, a sua utilização prática tem sido inviabilizada pela impossibilidade de cultivo “in vitro”, pois é um parasita obrigatório, além da necessidade de alta concentração de esporos no solo,

ocorrência de parasitismo somente em alguns estádios de vida do nematóide decorrendo, por conseguinte, insucessos nos testes com a bactéria em campo (Sayre, 1980b).

Bactérias que colonizam o interior das raízes das plantas, conhecidas como endofíticas, já demonstraram efeito sobre nematóides (Campos, Souza e Souza, 1998). Hallman et al., (1995), estudaram em casa de vegetação, o efeito antagonista de 72 isolados de bactérias endofíticas a *Meloidogyne incognita* em pepino. Sete isolados, *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *B subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. vesicularis*, *Serratia marcescens*, *Sphingomonas paucimobolis*, reduziram em mais de 50% à infecção pelo nematóide em relação ao controle sem inoculação bacteriana.

Quatro isolados de *Streptomyces* sp. e dois de *Bacillus* sp. provenientes do solo exerceram atividade nematicida sobre juvenis de *Pratylenchus penetrans* (Walker, Specht e Bekker, 1965). Katznelson e Henderson (1964), estudaram o efeito das culturas de actinomicetes, bactérias e fungos do solo sobre *Aphelenchoides paratienus* quando cultivados juntos em placas com ágar. Foi observado que 15% das 56 culturas de actinomicetes fizeram com que o nematóide *Aphelenchoides paratienus* se acumulasse ao redor da colônia. Quinze dias após, esse número subiu para 30%. Cinquenta e um isolados bacterianos dos 60 obtidos fizeram com que o nematóide se afastasse das colônias bacterianas nas placas. Das 54 culturas fúngicas testadas, 43 delas também tiveram o mesmo efeito.

2.2 Associação e antagonismo de nematóides com bactérias da rizosfera.

Schroth e Hancock (1981, 1982) citados por Weller (1988), definem o termo rizobactéria, como qualquer bactéria capaz de colonizar facilmente as

raízes na presença da microflora indígena do solo. Nesse grupo existem bactérias que afetam ou inibem o crescimento de outras bactérias, portanto, podem ser utilizados no controle de patógenos de plantas (Luz, 1996)

Rizobactérias existem em abundância no solo, são de fácil adaptação à produção massal pois podem ser cultivadas em meio de cultura, possibilitando formulações comerciais (Weller, 1988).

Algumas delas podem afetar a penetração dos nematóides nas raízes tornando antagonicas a esse grupo de patógeno (Sikora, 1988). Sete a dez por cento das rizobactérias isoladas das raízes da batata, beterraba e tomate, exibiram atividade antagonista a diferentes espécies de nematóides dos cistos, e das galhas (Becker et al., 1988; Klopfer, Schroth e Miller, 1992; Oostendorp e Sikora, 1986, 1990; Racke e Sikora, 1986, 1992; Sikora, 1988). Zavaleta-Mejia e Van-Gundy (1982), testaram cerca de 244 isolados de rizobactérias, através da inoculação de raízes de mudas de tomate e pepino, seguida do transplante para vasos com solo naturalmente infestado com o nematóide das galhas *Meloidogyne incognita*. Cerca de 12% desses isolados foram capazes de reduzir a população do nematóide, aumentando de 6 a 48% o peso seco das plantas e reduzindo o número de galhas em 8 a 49% quando comparados com a testemunha. Becker et al. (1988), visando o mesmo controle, testaram cerca de 5000 isolados bacterianos, oriundos da rizosfera de algumas espécies de plantas coletadas no estado da Califórnia nos Estados Unidos. Foram inicialmente realizados com os isolados bacterianos, testes “in vitro”, e posteriormente uma seleção dos melhores isolados em casa de vegetação. Nos testes “in vitro”, estudou-se a capacidade dos isolados bacterianos na produção de metabólitos que afetassem a mobilidade dos juvenis do nematóide. Já em casa de vegetação os testes realizados visaram o controle do nematóide em plantas de pepino cultivadas em vasos contendo substrato não esterilizado. Observou-se que desses 5000 isolados apenas 50

afetaram os juvenis in vitro, e desses apenas 10 foram capazes de controlar o nematóide em casa de vegetação. Sikora (1988), testou a capacidade da rizobactéria, *Bacillus subtilis* (A-13), e de alguns isolados de rizobactérias oriundas da rizosfera das plantas de beterraba, batata, algodão e amendoim na redução da infecção das raízes de plantas hospedeiras de algumas espécies de fitonematóides. Por exemplo, o isolado A-13 de *Bacillus subtilis*, foi testado contra *Meloidogyne incognita* usando como plantas hospedeiras o algodão e a beterraba, contra *Meloidogyne arenaria* em amendoim e contra *Rotylenchulus reniformis* em algodão. Os demais isolados de rizobactérias foram testados contra o nematóide dos cistos *Heterodera schachtii* e *Globodera pallida* e das galhas *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne arenaria* em plantas de beterraba. Como resultados, observou-se que o isolado A-13 de *Bacillus subtilis* reduziu a infecção pelos nematóides em todas as plantas testadas. A redução da penetração de *Meloidogyne* nas raízes variou de 38 a 66% em algodão, 45 a 68% em amendoim e 65% em beterraba. Com *Rotylenchulus reniformis* a redução da penetração do nematóide nas raízes foi de 59%. Os demais isolados de rizobactérias, também induziram significantes reduções na penetração pelo nematóide dos cistos e das galhas nas raízes da beterraba, algodão e amendoim. Do total de rizobactérias isoladas, 7,2% oriundas da rizosfera da beterraba, 9% da batata e 9,8% do algodão e amendoim tiveram efeito sobre o nematóide. Habe (1997), testou cerca de 156 isolados de rizobactérias oriundas da rizosfera de espécies nativas e invasoras da família solanácea, do cerrado do estado de Goiás (Brasil), contra o nematóide *Meloidogyne incognita* raça 1. O teste foi realizado em casa de vegetação, com tomateiro, sendo realizado em duas etapas. A primeira, consistiu em testar todos os isolados obtidos, e a segunda, em reavaliar somente os melhores isolados obtidos da primeira etapa. Obteve-se neste trabalho uma porcentagem de 10,3 % (16 dos 156 isolados testados) na primeira etapa e 3,8%

(6 em 156 isolados) na segunda etapa dos testes com atividades significativamente antagonicas à *Meloidogyne incognita*.

Dentre os diversos gêneros de rizobactérias isolados da rizosfera, e testados contra fitonematóides, as espécies do gênero *Pseudomonas*, principalmente as pertencentes ao grupo das fluorescentes, têm sido as antagonicas mais eficazes a esses patógenos, talvez devido a sua maior capacidade de colonização da rizosfera (Kluepfel, Mcinnis e Zehr, 1993). Oostendorp e Sikora (1990), obtiveram 290 isolados de bactérias na rizosfera da beterraba açucareira e trataram as sementes com esses isolados para conferir proteção às plantas contra o ataque do nematóide do cisto da beterraba *Heterodera schachtii* no campo. Oito dos isolados testados, mostraram-se ativos e eficazes na redução da penetração das raízes de beterraba pelo nematóide, sendo que, três deles eram *Pseudomonas fluorescens*. Kluepfel, Mcinnis e Zehr (1993), trabalhando com um solo supressivo ao nematóide *Criconemella xenoplax* causador da morte em mudas de pessegueiros, observaram que cerca de 2,4% das bactérias isoladas deste solo e que reduziram a população do nematóide, eram do gênero *Pseudomonas*. Westcott e Klupfel (1993), demonstraram que um isolado de *Pseudomonas aerofaciens* obtido das raízes de pessegueiro, oriunda de um solo supressivo à *Criconemella xenoplax*, foi capaz de inibir, “in vitro”, a eclosão de juvenis do nematóide.

Outros gêneros de rizobactérias, já demonstraram eficiência no controle de nematóides. Racke e Sikora (1992), comprovaram a eficiência das rizobactérias *Agrobacterium radiobacter* e *Bacillus sphaericus* no controle de *Globodera pallida*, conhecido como nematóide do cisto da batata. Cerca de 179 isolados bacterianos foram obtidos da rizosfera da batata e testados em condições de casa de vegetação contra o nematóide usando como planta hospedeira a batata. Desses 179 isolados, 16 causaram redução de 25% na

penetração do nematóide *Globodera pallida* nas raízes da batata. Entretanto, apenas seis desses isolados causaram redução significativa na penetração do nematóide nas raízes da batata em novo ensaio.

Bacillus é um gênero de rizobactéria que vem sendo considerado como forte agente de controle biológico de fitonematóides, devido a capacidade de produção de endosporos, os quais são tolerantes à condição de dessecação do solo, e de calor extremo (Weller, 1988). Vários pesquisadores têm estudado o efeito nematicida dessa bactéria. Leyns et al., (1995), testaram o efeito nematicida da mistura de esporos de três isolados de *Bacillus thuringiensis*, contra o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. O teste consistiu em adicionar alíquotas de cinquenta microlitros de esporos da bactéria dentro de pequenas placas contendo cinquenta microlitros de suspensão do nematóide com cerca de 200 a 400 juvenis e avaliado 8h após. Observou-se que a mortalidade dos juvenis variou de 50% a 60%, sendo que o nível de toxicidade variou entre os três isolados.

O número de isolados de rizobactérias, com potencial de uso no controle biológico tanto de fitonematóides como de outros patógenos, não é muito grande, compreendendo cerca de 10% da população dessas bactérias na rizosfera das plantas (Schroth e Hancock, 1981; Schroth e Hancock, 1982 ; Suslow e Schroth, 1982; Weller e Cook, 1986). Entretanto, as chances de sucesso no controle biológico serão aumentadas caso a bactéria seja isolada no mesmo local onde será aplicada no controle do patógeno, ou isolada de um solo supressivo onde a população do patógeno é baixa (Schneider, 1982). A rizosfera da planta, de onde se faz o isolamento das rizobactérias, parece também influenciar na quantidade de isolados com capacidade de afetar o desenvolvimento dos fitonematóides. Kloepper, Schroth e Miller (1992), isolaram bactérias da rizosfera de plantas conhecidas como antagonistas a fitonematóides, como *Mucuna deeringiana*,

Ricinus comunis, *Cannavalia ensiformis*, *Secale cereale* e compararam esses isolados com outros obtidos da soja quanto a capacidade de controlar o nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* e do cisto *Heterodera schachtii* em plantas de soja em micropotes. Foi observado uma frequência de quatro a seis vezes maior de isolados bacterianos eficientes no controle dos fitonematóides oriundos das plantas antagonistas do que aqueles isolados da rizosfera da soja e testados em soja.

2.2.1 Métodos de isolamento de rizobactérias

Vários métodos têm sido empregados para isolar bactérias das raízes das plantas com posterior plaqueamento em meio seletivo. A maioria dos métodos consiste em agitar vigorosamente as raízes das quais deseja-se isolar as bactérias dentro de tubos ou frascos de vidro contendo água estéril, solução tampão ou $MgSO_4$ (0,1M), por determinado período de tempo (Bahme et al., 1988; Bahme e Schroth, 1987; James, Suslow e Stinback, 1985; Howie e Echandi, 1983; Kloepper, Schroth e Miller, 1980; Loper, Suslow e Schroth, 1984; Oostendorp e Sikora, 1989). Como alternativa, às raízes podem ser colocadas em sonificador com solução tampão (Parke, Liddell e Clayton, 1990), ou trituradas com pistilo usando um almofariz (Weller e Cook, 1983). A seguir a suspensão de raízes e bactérias passa pelo método de diluição e plaqueamento em meio seletivo que permita o crescimento das bactérias.

Outro método de isolamento de bactérias, consiste em lavar as raízes em solução tampão tendo-se o cuidado de recolher a solução usada na lavagem, diluí-la e plaqueá-la em meio de cultura (Becker et al., 1988).

2.2.2 Modo de ação das rizobactérias na redução populacional de nematóides

Os mecanismos de ação das rizobactérias envolvidas no controle de nematóides incluem: competição por nutrientes ou oxigênio, competição por nicho ecológico; produção de antibióticos, enzimas ou outros metabólitos no local de estabelecimento dos nematóides; degradação de exsudatos radiculares afetando o estímulo a eclosão do nematóide do cisto; interferência no processo de reconhecimento da raiz pelo nematóide devido a ação das bactérias nas lectinas; ativação de mecanismos de defesa da planta induzido pela bactéria (Weller, 1988; Higinbotham, 1968; Wood e Paleg, 1972; Cleland, 1990 e Hagen, 1990; Oostendorp e Sikora, 1990; Stirling, 1991).

Muitos isolados bacterianos podem talvez utilizar-se de diversos mecanismos ao mesmo tempo (Habe, 1997). Portanto, torna-se difícil estabelecer o mecanismo exato de antagonismo entre o nematóide e a bactéria da rizosfera. Soma-se a isto a interação e relações com outros fatores formando o complexo Rizobactéria-Nematóide-Planta-Ambiente.

A hipótese de competição por nutrientes ou oxigênio no mesmo sítio de alimentação do nematóide, deve ser no mínimo nula, devido a diferença de tamanho entre os organismos competidores e os modos diversificados da alimentação deles (Weller, 1988).

A produção localizada de antibióticos, enzimas e outros metabólitos por bactérias no local de estabelecimento dos nematóides também pode explicar o possível antagonismo das rizobactérias a esse patógeno, tanto que algumas rizobactérias já demonstraram a capacidade de produzir substâncias tóxicas a nematóides como as do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Chromobacterium* e *Enterobacter* (Fortuner e Jacq, 1976; Johnston,

1959; Rodrigues-Kabana, Jordan e Hollis, 1965; Wilt e Smith, 1970; Lizuka et al., 1962; Becker et al., 1988)

Os exudatos radiculares além de atrair o nematóide na direção da ponta das raízes permitindo o seu parasitismo, também influenciam o ciclo de vida de alguns nematóides, principalmente os do cisto (Sikora, 1988). Dessa forma a degradação desses exsudatos por rizobactérias influenciariam drasticamente o reconhecimento da raiz pelo nematóide e o seu desenvolvimento principalmente daqueles em que a eclosão é afetada por exsudatos radiculares (Oostendorp e Sikora, 1990).

Outra hipótese é que às rizobactérias podem interferir no processo de reconhecimento da planta hospedeira pelo nematóide, atuando nas lectinas da superfície das raízes, pois suspeita-se que a interação entre as lectinas e os carboidratos presentes na superfície dos nematóides talvez seja um pré-requisito para a penetração dos nematóides (Stirling, 1991; Zuckerman e Jansson, 1984). O contato direto das rizobactérias com os tecidos radiculares pode, também, levar à planta a ativar mecanismos de defesa. Também às rizobactérias podem agir diretamente afetando o desenvolvimento do nematóide sem causar diretamente sua morte.

2.2.3 Perspectivas das pesquisas com rizobactérias no controle de fitonematóides e possível uso no campo.

São poucos os trabalhos de controle biológico de fitonematóides envolvendo o uso de rizobactérias. Apesar disso, os resultados até então alcançados já demonstram grande potencial desses microorganismos como agentes de controle biológico de nematóides. Estímulo maior decorre da facilidade de crescimento e adaptação dessas bactérias na rizosfera, além de possibilitar

formulação comercial. Daí a necessidade de se enfatizar pesquisas sobre a sua aplicação no campo.

Salienta-se que ainda, são necessários alguns estudos para se chegar a aplicação no campo. Inicialmente, necessita-se entender melhor, a interação entre as rizobactérias, plantas, fitonematóides e o solo, abrindo assim melhores perspectivas para o estudo de dose e meios e épocas de aplicação no campo.

2.3 Fungos da rizosfera associados a fêmeas de nematóides.

Fungos que colonizam às estruturas reprodutivas dos nematóides parasitas de plantas principalmente ovos e cistos, já são conhecidos há muito tempo. J.Kühn (1877) citado por Kerry (1980), encontrou o fungo *Catenaria auxilliaris* destruindo fêmeas do nematóide do cisto *Heterodera schachtii*. Desde então, muitos trabalhos têm relatado a ocorrência do parasitismo de fungos em ovos, cistos e fêmeas do nematóides do cisto e das galhas (Willcox e Tribe, 1974; Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1981; Clovis e Nolan, 1983; Godoy, Rodriguez-Kábana e Morgan-Jones, 1982, Costa, Campos e Menezes, 1997, Silva e Campos, 1991; Naves e Campos, 1991; Ribeiro e Campos, 1993; Costa e Campos, 1997).

Nematóides pertencentes à família Heteroderidae, são vulneráveis ao ataque de fungos, devido à natureza sedentária da fase adulta e à produção de ovos em massa, que é constituída principalmente de glicoproteínas favorecendo principalmente o ataque de fungos (Decker, 1989; Kerry e Mullen, 1981). São muitas às espécies de fungos associados a cistos e fêmeas de *Globodera*, *Heterodera* e *Meloidogyne* nas regiões tropicais. Freire e Bridge (1985), isolaram de matriz gelatinosa de fêmeas de *Meloidogyne incognita*, obtidas de raízes de pimenta do reino, os fungos *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium*

chlamydosporium, *Aspergillus* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp e *Trichoderma* sp. Geralmente os fungos que colonizam fêmeas de nematóides são zoospóricos, pertencentes ao Filo Mastigomycota ou oportunistas cuja atividade de parasitismo, ainda não é muito conhecida (Morgan-Jones e Rodrigues-Kabana, 1985).

A natureza do parasitismo desses fungos pode ser obrigatória e facultativa. Os parasitas obrigatórios são poucos e muito especializados, capazes de invadir às fêmeas em poucos dias de exposição, na superfície das raízes.

A maioria dos fungos que colonizam fêmeas de nematóides, vive no solo como saprófitas facultativos e são parasitas de ovos (Jatala, 1986). *Nematophthora gynophila*, é importante parasita obrigatório de fêmeas de *Heterodera* (Kerry, 1980; Kerry, Crump e Mullen, 1982). Esse, fungo já foi encontrado parasitando fêmeas de *Meloidogyne acronea* Coetzee (Kerry e Crump, 1977). Os fungos *Catenaria auxiliares*, *Nematophthora gynophila* e fungos Lagenidiaceo têm sido encontrados atacando fêmeas do nematóide dos cistos (Kerry e Crump, 1977).

Stirling e Mankau (1978), encontraram fungo *Dactylella oviparasitica* parasitando fêmeas de *Meloidogyne*. Os parasitas facultativos encontrados em fêmeas de nematóides são, também, em muitos casos, parasitas de ovos (Jatala, 1986). Morgan-Jones e Rodrigues-Kabana (1980), descreveram o fungo *Verticillium chlamydosporium*, como tipicamente parasito de ovos e de fêmeas maduras de *Meloidogyne arenaria*. Ribeiro e Campos (1993), isolaram de massas de ovos de *Meloidogyne* spp. os fungos *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquandii*, *P. inflatus*, *Verticillium chlamydosporium*, *Penicillium* sp., *Gliocladium roseum* e *Syrialidium* sp. Jatala, Kaltenbach e Boncagel (1979), relataram em batata no Peru a colonização de 70 a 90% dos ovos de cada fêmea de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne acrita* pelos fungos *Verticillium*

chlamydosporium e *Paecilomyces lilacinus*. Esses fungos também têm sido encontrados associados as fêmeas de *Heterodera schachtii* e *Heterodera avenae* em alguns países da Europa (Bursnall e Tribe, 1974; Willcox e Tribe, 1974; Kerry, 1980 e Tribe, 1979).

Nectria haematococca f. sp *piperis*, *Phytophthora palmivora*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*, também têm sido isolados de massas de ovos e de fêmeas maduras de *Meloidogyne incognita*, extraídas das raízes de pimenta do reino. Testes “in vitro” demonstraram a colonização de todas as fêmeas de *Meloidogyne incognita* (Freire e Bridge, 1985).

Santos (1991), isolou alguns fungos chamados de oportunistas, oriundos de raízes galhadas, porém colonizando massas de ovos de fêmeas de *Meloidogyne*. Dentre eles destacam-se: *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *A. niger*, *Fusarium equiseti*, *F. solani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium* spp., *P. decumbens* e *Trichoderma harzianum*. Um isolado do fungo *Cylindrocarpon destructans* já foi encontrado parasitando fêmeas de *Meloidogyne* sp., em raízes de pessegueiro em Pelotas, Rio Grande do Sul (Freitas, Ferraz e Muchovej, 1995).

Segundo Kerry (1988), cerca de 150 espécies de fungos oportunistas têm sido encontrados parasitando ovos e colonizando fêmeas do nematóide do cisto. Chen et al., (1994), isolaram de fêmeas do nematóide do cisto da soja, *Heterodera glycines*, em campos da Florida nos Estados Unidos, os fungos *Neocosmospora vasinfecta*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Dictyochaeta coffeae*, *Dictyochaeta heteroderae*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Exophiala pisciphila*, *Gliocladium catenulatum*, *Stagonospora heteroderae*. *Fusarium oxysporum*, foi o fungo mais freqüentemente isolado em fêmeas de *Meloidogyne arenaria*, em um experimento visando testar a eficiência de espécies de *Gliocladium*, *Paecilomyces* e *Verticillium* no controle de *Meloidogyne arenaria* no campo. Nesse trabalho, além do *Fusarium* foram

isolados de fêmeas do nematóide os fungos *Verticillium lamellicola*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium catenulatum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces nostocoides* e *Verticillium chlamydosporium* (Rodrigues-Kabana et al., 1984). Costa, Campos e Menezes (1997), isolaram fungos de cistos de *Heterodera glycines*, entre eles, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium viride*, *Syrialidium* sp., *Dactylaria* sp., *Penicillium* sp., *Eurotium repens*, *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces variotii*. Os mais freqüentemente isolados foram *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*.

3 METODOLOGIA GERAL

As bactérias isoladas da rizosfera de algumas plantas, foram estudadas em experimentos montados em casa de vegetação. Os fungos isolados de fêmeas foram estudados “in vitro”. Portanto, em casa de vegetação foram montados dois experimentos em épocas diferentes para se estudar o efeito dessas rizobactérias quanto a capacidade de reduzir o ataque do nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, a raízes de tomateiro cv. ‘Santa Cruz Kada’. Inicialmente as rizobactérias foram isoladas da rizosfera de algumas plantas coletadas na zona rural de Lavras (Serrinha) e no campus da UFLA. Em seguida, expandiu-se o isolamento para rizosfera de plantas dos municípios de Ijaci e Ribeirão Vermelho. Em seguida, montaram-se experimentos, com a bacterização das raízes de mudas de tomate com os isolados obtidos, seguido do transplantio dessas mudas para tubetes contendo o substrato Plantmax. Dez dias após foram colocados 400 ovos de *Meloidogyne javanica* por tubete, e após 30 dias o experimento foi avaliado. Como parâmetros de avaliação, pesou-se a matéria seca do tomateiro, quantificou-se o número de galhas e o número de ovos por grama de raiz. Os dois experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), tendo 4 repetições por isolado bacteriano. No primeiro experimento, cada repetição foi constituída de parcelas de duas plantas e no segundo de três plantas. O tratamento testemunha nos dois experimentos constituíram-se sempre de muda sem bactéria.

“In vitro”, mediu-se o parasitismo em *Meloidogyne javanica* por fungos isolados internamente e externamente ao corpo de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Após o isolamento dos fungos, montou-se o experimento em placas de Petri contendo ágar-água 2%. Para isto colocaram-se os fungos isolados, perto das

fêmeas de *Meloidogyne javanica* livres de contaminação por fungos ou bactérias. Doze dias após, cada fêmea foi colocada em uma lâmina escavada com uma gota de azul de algodão para facilitar a visualização do micélio fúngico sobre a fêmea. As observações foram feitas com auxílio de um microscópio de objetiva invertida no aumento de 1000x. Foi então avaliado o número de fêmeas de *Meloidogyne javanica* que continham hifas fúngicas no seu corpo e calculada a porcentagem de parasitismo por esses fungos.

4 LITERATURA CITADA

- ADAMS, R.E.; EICHENMULLER, J.J. A bacterial infection of *Xiphinema americanum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.53, n.9, p.745, Sept. 1963.
- ANGIERI FILHO, C.; CAMPOS, V.P. Controle de *Meloidogyne javanica* em jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. *Nematologia Brasileira*, Pelotas, v.21, n.2, p. 23-30, 1997.
- BAHME, J.B.; SCHROTH, M.N. Spatial - temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs on potato. *Phytopathology*, Saint Paul, v.77, n.7, p.1093 - 1100, July . 1987.
- BAHME, J.B.; SCHROTH, M.N.; VAN GUNDY, S.D.; WINHOLD, A.R.; TOLENTINO, D.M. Effect of inocula delivery systems on rhizobacterial colonization of underground organs of potato. *Phytopathology*, Saint Paul, v.78, n.7, p. 534 - 542, July . 1988.
- BECKER, J.O.; ZAVALITA-MEIJIA, E.; COLBERT, S.F.; SCHROTH, M.N.; WEINHOLD, A.R. HANCOCK, J.G.; VAN GUNDY, S.D. Effects of Rhizobacteria on Root-Knot Nematodes and Gall formation. *Phytopathology*, Saint Paul, v.78, n.11, p. 1466-1469, Nov. 1988.
- BURSNALL, L. A.; TRIBE, H.T. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. 2. egg parasites of *H. schachtii*. *Transactions of the Bristish Mycological Society*, v.62, n.3, p. 595-601, June 1974.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.3, p.361-365, Setembro, 1997.
- CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. In: LUZ, W.C. DA; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Eds). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: RAPP, 1998. p.285-327.

- CARDOSO, E.J.B.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N. ; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, p. 42-57.
- CHEN, S.; DICKSON, D. W.; KIMBROUGH, J.W.; MCSORLEY, R.; MITCHELL, D.J. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a florida soybean field. **Journal of Nematology**, Iowa, v.26, n.3, p.296 - 303, Feb. 1994.
- CLELAND, R. E. Auxin and cell elongation. In : **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Davies, P.I. (ed). Dordrecht: Kluwer, 1990, p. 132-148.
- CLOVIS, C.J.; NOLAN, R.A. Fungi associated with cysts, eggs, and juveniles of golden nematode (*Globodera rostochiensis*) in Newfoundland. **Nematologica**, Leiden, v.29, n.3, p. 346-356, Sept. 1983.
- COSTA, S.B.; CAMPOS, V.P.; MENEZES, M. Fungos associados a cistos de *Heterodera glycines* no brasil. **Nematologia Brasileira**, Pelotas, v.21, n.2, p.31-37, 1997.
- DECKER, H. Biological control of plant parasitic nematodes. In: DECKER, H. (eds.). **Plant nematodes and their control (phytonematology)**, New Delhi: Pauls Press, 1989. p. 62-63.
- DOLLFUS, R.P. Parasites des helminthes. In: DOLLFUS, R.P. (eds.). **Encyclopedie Biologique**, Paris: P. Lechevalier, 1946. v. 27. p. 482.
- FORTUNER, R.; JACQ, V.A. *In vitro* study of toxicity of soluble sulphides to three nematodes parasitic on rice in senegal. **Nematologica**, Leiden, v.22, n.3, p. 343-351, Sept. 1976.
- FREIRE, F.C.O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, p. 577-596, 1985.

- FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J.** Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* na isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, Florida, v.25, n.2, p.109-115, Dec. 1995.
- GODOY, G.R. ; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.** Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica*, Florida, v.12, n.1, p. 111-119, June 1982.
- HAGEN, G.** The control of gene expression by auxin. In: **DAVIES, P.J.** *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p 149-163.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.; RODRIGUES-KÁBANA, R.; SIKORA, R.A.** Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. *Phytopathology*, v.85, n.10, p. 1136, Oct. 1995.
- HABE, M.H.** Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP - no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro. Brasília: UNB, 1997. 109p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HIGINBOTHAM, N.** Cell eletropotential and ion transport in higher plants. In : **MOTHES, K.** (ed.) *Transport and distribution of matter in cells of higher plants*. Berlin: Springer, 1968. 215p.
- HILTNER, L.** Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berucksichtigung der grundungung und brache. *Erb. Deut. Landwirtsch. Ges.*, Bonn, v.98, p.59-78, 1904.
- HOLLIS, J.P.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.** Rapid kill of nematodes in flooded soil. *Phytopathology*, Saint Paul, v.56, n.6, p.1015-1019, June 1966.
- HOLLIS, J. P. ; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.** Fatty acids in Louisiana rice felds. *Phytopathology*, Saint Paul, v.57, n.5, p. 841-847, May 1967.
- HOWIE, W.J.; ECHANDI, E.** Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biology & Biochemistry*, Great Britain, v.15, n.2, p.127-132, 1983.

- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 452 - 489, 1986.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BONCAGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes. **International Potato Center**, Lima, v..3, 3 p, 1979.
- JAMES, D.W.; SUSLOW, T.V.; STINBACK, K.E. Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. **Applied Environment of Microbiology**, v.50, n.2, p.392 - 397, Aug. 1985.
- JOHNSTON, T.M. Effect of fatty acids mixtures on the rice stylet nematode (*Tylenchorhynchus martini* Fielding, 1956). **Nature**, London, v.183, n.3696, p.1392, 1959.
- KATZNELSON, H.; HENDERSON, V.E. Interactions of *Aphelenchoides parietinus* (bastian, 1865) steiner 1932 with actinomycetes, bacteria, and fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.10, n.564, p. 37-41, 1964.
- KERRY, B.R. Biocontrol: fungal parasites of female cyst nematodes. **Jornal of Nematology**, England, v. 12, n. 4, p. 253-259, Oct.1980.
- KERRY, B.R. Biological Control. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. **Principles and pratice of nematode control in crops**. London : Academic Press, 1987. p.233-263.
- KERRY, B.R. Fungal parasites of cyst nematodes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Netherlands, v.24, p. 293-305, Apr. 1988.
- KERRY, B. R.; CRUMP, D.H. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. **Nematologica**, Leiden, v.23, p.193-201, 1977.
- KERRY, B.R.; MULLEN, L.A. Fungal parasites of some plant parasitic nematodes. **Nematropica**, Florida, v.11, n.1, p. 187-189, June. 1981.

- KERRY, B. R. ; CRUMP, D.H. ; MULLEN, L.A. Natural control of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* woll., by soil fungi at three sites. *Crop Protection*, St Paul, v.1, p. 99-109, 1982.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, Saint Paul, v.70, n.11, p. 1078-1082, Nov. 1980.
- KLOEPPER, J.W., KÁBANA, R.R., McINROY, J.A.; YOUNG, R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil*, Netherlands, v.139, n.1, p.75-84, Jan. 1992.
- KLUEPFEL, D.A.; McINNIS, T.M; ZEHR, E.I. Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Crictonemella xenoplax*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 83, n.11, p.1240-1245, Nov. 1993.
- LEYNS, F.; BORGONIE, G.; ARNAUT, G.; WAELE, D. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fundamental and Applied Nematology*. St Paul, v.18, n.3, p. 211-218, 1995.
- LIZUKA, H.; KOMAGATA, T.; KUNII, Y.; SHIBUYA, M. Nematocidal action of microorganisms. *Agric. Biol. Chem*, v.26, p.199, 1962.
- LOPER, E.E. ; SUSLOW, T.V. ; SCHROTH, M.N. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology*, Saint Paul, v.74, n.12, p.1454-1460, Dec. 1984.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. In: LUZ, W.C. DA; FERNANDES, J.M. ; PRESTES, A.M. ; PICININI, E.C. (Eds). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo : RAPP, 1996. p.1-49.

- MANKAU, R. Microbial control of nematodes. In: ZUCKERMAN, B.R.M; ROHDE (ed) **Plant-Parasitic Nematodes**. New York: Academic Press, v.3, 1981. p.475-494.
- MOJE, W. Structure and nematocidal activity of allylic and acetylenic halides. **Agri. Food Chem**, v.7, p. 702-707, 1959.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES- KABANA, R. Species of *Verticillium* and *Paecilomyces* as parasites of cysts and root-knot nematodes. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.9, p. 884-889, Sept. 1980.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES- KABANA, R. Fungi associated with cysts of *Heterodera glycines* in na Alabama soil. **Nematropica**, Florida, v.11,n.1, p. 69-74, 1981.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES- KABANA, R. Phytonematode pathology: fungal modes of action a perspective. **Nematropica**, Alabama, v.15, n.1, p.107-114, 1985.
- NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de minas gerais e estudos da capacidade predatória e do crescimento "in vitro" de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.2, p.152-162, 1991.
- OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. Utilization of antagonistic rhizobacteria as a seed treatment for the biological control of *Heterodera schachtii* in sugar beet. **Revue de Nématologie**, Paris, v.9, n.3, p.304, Mar. , 1986.
- OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera shachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, Paris, v.1, n.12, p. 77-83, Dec. 1989.
- OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bactéria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, Paris, v.13, n.3, p. 269-274, Mar. 1990.

- PARKE, J.L.; LIDDELL, C.; CLAYTON, M.K. Relationship between soil mass adhering to pea taproots and recovery of *Pseudomonas fluorescens* from the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. Great Britain, v.22, n.4, p.495-499, 1990.
- PRAMER, D. Nematode-trapping fungi. *Science*. Saint Paul, v.144, n.3617, p.382-387, Apr. 1964.
- PRASAD, S.S.V.; TILAK, K.V.B.R.; GOLLAKOTA, K.G. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the survival and egg hatching of *Meloidogyne* spp. the causative agent of root-knot disease. *Journal Invertebrate Pathology*, v.20, n.3, p.377-378, May 1972.
- RACKE, J.; SIKORA, R.A. Influence of rhizobacteria on *Globodera pallida* early root infection and *Erwinia carotovora* tuber soft rot of potato *Revue de Nématologie*, Paris, v. 9, p. 305, 1986.
- RACKE, J.; SIKORA, R.A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Soil Biology & Biochemistry*, Great Britain, v. 24, n.6, p. 521-526, 1992.
- RIBEIRO, R.C.F.; CAMPOS, V.P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento "in vitro" de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. no sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.17, n2, p.132-139, 1993.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; JORDAN, J.W.; HOLLIS, J.P. Nematodes: Biological control in rice fields: Role of hydrogen sulfide. *Science*, Louisiana, v.148, n.3669, p.524, April 1965.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES ; GINTIS, B.O. Effects of chitin amendments to soil on *Heterodera glycines*, microbial population, and colonization of cysts by fungi. *Nematropica*, Florida, v.14, n.12, p.10-25, 1984.
- SANTOS, M.A.DOS. FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.15, n.2, p.121-134, 1991.

- SASSER, J. N. **Plant-parasitic nematodes : the farmers hidden enemy**. Raleigh : North Carolina State University Graphics, 1989. 115p.
- SAYRE, R.M. Promising organisms for biocontrol of nematodes. **Plant Disease**, Saint Paul, v.64, n.6, p. 526- 532, 1980.
- SAYRE, R.M. Pathogens for biological control of nematodes.**Plant disease**, Beltsville, v.69, n.1, p.275-276, Jan.1985.
- SCHNEIDER, R.W. **Suppressive soils and plant disease**. St Paul: **American Phytopathology, Soc**, 1982. 88p.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.35, p. 453-476, 1981.
- SCHROTH, M.N. ; HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, Palo Alto, v.216, n.4553, p. 1376-1381, Jun. 1982.
- SCHROTH, M.N.; LOPER, J.; HILDEBRAND, D.C. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. **Phytopathology**, v.52, n.2, 362 - 369, Feb. 1984.
- SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv, Bonn**, v.2, n.53, p. 867-878, 1988.
- SILVA, J.F.V.; CAMPOS, V.P. Fungos endoparasitas de nematóides que ocorrem no Sul de Minas Gerais, Brasil. 2. Resultados de tratamentos e avaliação "in vitro" da capacidade predatória de *Haptaglossa heterospora*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.2, p.104-110, 1991.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 1988. 235p. (Programa ciências Agrárias nos Trópicos Brasileiros).
- SOUZA, J.T.; CAMPOS, V.P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Pelotas, v.21, n.2, p. 93-102, 1997.

- STIRLING, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 74, n.1, p. 55-60, Apr. 1984.
- STIRLING, G.R.; MANKAU, R. *Dactylella oviparasitica*, a new fungal parasite of *Meloidogyne* eggs. *Mycologia*, Lancaster, v.70, n.4, p. 774 - 785, July. 1978.
- STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. England: CAB int, 1991. 282p.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Rhizobacteria of sugar beet. Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, Saint Paul, v.72, n.2, p.199-206, Feb. 1982.
- TRIBE, H.T. Extent of disease in populations of *Heterodera*, with especial reference of *H. schachtii*. *Annals of Applied Biology*, New York, n.92, p.61-72, 1979.
- TRIBE, H. T Prospects for the biological control of plant parasitic nematodes. *Parasitology*, v.81, p. 619-639, 1980.
- ZAVALETA-MEJIA, E.; VAN GUNDY, S.D. Effects of rhizobacteria on *Meloidogyne* infection. *Journal of Nematology*, Delon Springs, v.14, n.4, p. 475-476, 1982.
- ZUCKERMAN, B.M.; JANSSON, H.B. Nematode chemotaxis and possible mechanism of host/prey recognition. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v. 22, p. 95-113, 1984.
- WALKER, J. T.; SPECHT, C.H.; BEKKER, J.F. Nematocidal activity to *Pratylenchus penetrans* by culture fluids from actinomycetes and bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v.12, n.164, p. 347-351, Oct. 1965.

- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v..26, p. 379- 407, 1988.
- WELLER, D.M.; COOK, R. J. Supression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonads*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, n.3, p. 463-469, Marc. 1983.
- WELLER, D.M.; COOK, R.J. Suppression of root diseases of wheat by fluorescent pseudomonads and mechanisms of action. **Phytopathology**, v.13, n.1, p. 99-107, Jan. 1986.
- WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D.A. Inibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.11, p. 1245-1249, Nov. 1993.
- WILLCOX, J.; TRIBE, H.T. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. **Transactions of the British Mycological Society**, England, v.62, n.3, p. 585-594, 1974.
- WILT, G.R; SMITH, R.E. Studies on the interactions of aquatic bacteria and aquatic nematodes. **Water Resour. Res. Inst. Bull**, v.1, p.701, 1970.
- WOOD, A.; PALEG, L.G. The influence of giberellic acid on the permeability of model membrane systems. **Plant Physiology**, California, v. 50, p.103-108, 1972.

CAPITULO 2

RIZOBACTÉRIAS ANTAGONISTAS A *Meloidogyne javanica*

RESUMO

COIMBRA, João Luiz. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*. In: _____. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 1998. Cap. 2, p.30–61. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

Foram obtidos 130 isolados bacterianos a partir da rizosfera das seguintes espécies de plantas: tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), lablab (*Dolichos lablab* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), capuchinha (*Trapaolum majus* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.), coletadas na região rural dos municípios de Lavras (MG), Ijaci (MG) e Ribeirão Vermelho (MG). Os isolados obtidos foram testados no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro, através de dois experimentos montados em duas épocas diferentes, na casa de vegetação. Para montagem dos experimentos, plantas de tomate tiveram suas raízes bacterizadas e em seguida, transplantadas para bandejas de tubetes contendo substrato Plantmax onde foi feita a inoculação com ovos de *Meloidogyne javanica*. Trinta dias após realizou-se a avaliação dos experimentos. Cinquenta e três isolados (40,76%) demonstraram antagonismo ao nematóide; desses, 32 reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro através da redução do número de galhas e 47 isolados reduziram o número de ovos. Dos isolados que reduziram o número de galhas, o maior número deles veio de alface e do tomate coletados na região de Ijaci, correspondendo a 35% e 23% respectivamente do total amostrado.

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

ABSTRACT

COIMBRA, João Luiz. Antagonistic rhizobacteria to *Meloidogyne javanica*. In: _____. **Antagonistic rhizobacteria to *Meloidogyne javanica*, isolation and parasitism of *Meloidogyne* spp. Female Fungi.** Lavras: UFLA, 1998. Cap.2, p. 30–61 (Dissertation – Master Program in Phytopathology)*

A hundred thirty bacterial isolates were obtained from rhizosphere of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill), okra (*Hibiscus esculentus* L.), coffee (*Coffea arabica* L.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), lablab (*Dolichos lablab* L.), castor bean (*Ricinus communis* L.), marigold (*Tagetes erecta* L.), “capuchinha” (*Trapaecolum majus* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.), collected from Lavras, Ijaci and Ribeirão Vermelho counties of Minas Gerais state, Brazil. Two screening experiments were done by inoculating tomato seedlings with the bacterial isolates in greenhouse followed by *Meloidogyne javanica* eggs inoculation. Thirty days later were avaliated the number of eggs per tomato plant, number of galls per plant and shoot dry weight. Fifty three isolates (40,76%) demonstrate antagonistic effect in nematode. Thirty two isolates reduced the number of galls per plant and fourty seven isolates reduced the number of eggs per plant. Isolates from lettuce and tomato were the most frequent in reducing eggs per plant, but at least, a few isolates from each plant sampled had the same effect.

*Guidance Commitee: Vicente Paulo Campos (Major Professor), Ricardo Magela de Souza – UFLA and Romildo da Silva – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Aos organismos antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematóides incluem: rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, bactérias parasitas obrigatórias, fungos parasitas e patógenos de ovos, fungos predadores e parasitas, patógenos de fêmeas, fungos endoparasitas e endomicorrizas (Sikora , 1992).

O controle biológico de nematóides por bactérias apenas mereceu atenção dos pesquisadores nas últimas décadas. Sendo que a ênfase nesses estudos têm sido dada apenas a bactérias parasitas de nematóides do gênero *Pasteuria* e as rizobactérias (Campos, Souza e Souza, 1998).

Rizobacterias isoladas da rizosfera de plantas têm a capacidade de limitar a penetração dos nematóides nas raízes, podendo, assim atuar como agentes no controle biológico de fitonematóides (Sikora, 1988). Além disto podem exercer efeitos benéficos ao desenvolvimento das plantas através da promoção do crescimento (Kloepper et al., 1990).

A principal vantagem de se trabalhar com rizobactéria, está na abundância de sua ocorrência no solo, além da facilidade na produção massal e do preparo de formulações comerciais. Essas bactérias têm vantagens sobre os fungos, pois a rizosfera das plantas, onde crescem, constitui ambiente relativamente estável, com ilimitada e contínua fonte de nutrientes provida pelo exudato radicular (Schönbeck, Klingauf e Kraus, 1988).

Desta forma objetivou-se neste trabalho:

- 1 - Isolar bactérias da rizosfera de diversas plantas.
- 2 - Selecionar isolados bacterianos para proteção do sistema radicular de plantas comerciais.

2 METODOLOGIA

2.1 Locais de coleta e isolamento de rizobactérias.

Foram obtidas amostras de diversas espécies vegetais colhidas em diferentes localidades de Lavras e região (TABELA 1).

TABELA 1- Locais de coleta e os hospedeiros amostrados.

Planta amostrada	Locais de coleta
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	Ribeirão Vermelho, Ijaci e Lavras (Serrinha)
Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Ribeirão Vermelho e Ijaci
Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Lavras (Serrinha)
Lab-Lab (<i>Dolichos lablab</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Lavras (Serrinha)
Cravo de defunto (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Capuchinha (<i>Trapaeolum majus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)

As raízes coletadas no campo foram umedecidas, acondicionadas cuidadosamente em sacos plásticos e transportadas para o laboratório. No laboratório realizou-se o isolamento de rizobactérias adotando-se os métodos também seguidos por Oostendorp e Sikora (1989), com algumas adaptações. Desta forma, as raízes, foram ligeiramente lavadas com a água de torneira para eliminar o excesso de solo, e então cortadas em pedaços pequenos. Pesaram-se 10g de raízes em uma balança eletrônica e em seguida agitaram-nas em liquidificador com 150 ml de solução salina de MgSO_4 a 0,1 molar (0,1M) por 2 minutos para facilitar a liberação das bactérias. A seguir, procedeu-se a diluição em série da suspensão obtida em solução salina de MgSO_4 (0, 1M), com fator de diluição de 1:10 até 10^{-5} . Foram retiradas alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-3} e 10^{-4} sendo então distribuídas e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo o meio 523 de Kado e Heskett (1970), composto de caseína hidrolisada, extrato de levedura, MgSO_4 , K_2HPO_4 e dextrose. As placas foram, então, incubadas à 25°C durante 2 a 3 dias em câmara de crescimento (BOD).

Após esse período, foram selecionadas diferentes colônias bacterianas que apareceram em maior quantidade no meio. Os diferentes isolados obtidos foram repicados assepticamente em câmara de fluxo laminar para tubos de ensaio contendo o meio 523 inclinado, e a seguir armazenados e conservados em câmara fria a 10° C. A cada duas semanas repetia-se a repicagem.

Com a finalidade de preservar os isolados por um maior período de tempo, esses foram, repicados, assepticamente para o meio líquido peptona-glicerol, composto de glicerol, peptona, K_2HPO_4 e incubados a 25°C por 48 horas. A seguir, as suspensões bacterianas foram transferidas assepticamente para tubos de Eppendorf, os quais foram então fechados e conduzidos ao freezer onde foram mantidos à temperatura de - 80 ° C.

2.2 - Efeito de isolados de rizobactérias no crescimento do tomate e no dano causado por *Meloidogyne javanica* em condições de casa de vegetação.

Foram montados dois experimentos em casa de vegetação, para selecionar, entre os isolados de rizobactérias obtidos conforme o item 2.1, aqueles com capacidade de reduzir o ataque às raízes de tomate cv Santa Cruz Kada pelo nematóide das galhas *Meloidogyne javanica*. Os experimentos foram montados em bandeja de tubetes com 36 gramas do substrato Plantimax/ tubete e em duas épocas distanciadas de 2 meses.

2.2.1 - Obtenção das mudas de tomate usadas para montagem do experimento

Para obtenção das mudas, desinfestaram-se superficialmente sementes de tomate 'Santa Cruz Kada' imergindo-as em solução de hipoclorito de sódio à 1% por 5 minutos com auxílio de uma peneira. Em seguida, as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada e então semeadas em bandejas de plástico contendo areia autoclavada a 120° C durante 2 horas em dois dias consecutivos. As bandejas ficaram em casa de vegetação, protegidas por sombrite e foram irrigadas diariamente até completar 15 dias, estágio no qual as mudas encontravam-se com duas folhas verdadeiras.

2.2.2 - Preparo do inóculo bacteriano e montagem dos experimentos.

As colônias de rizobactérias isoladas e preservadas conforme descrito em 2.1, foram repicadas com auxílio de uma alça de cromo níquel para placas de Petri contendo o meio 523 e em seguida colocadas à temperatura de 25 ° C em

câmara de crescimento (BOD). Após 48 horas, foram preparadas suspensões com os isolados bacterianos adicionando-se às placas solução salina de MgSO_4 a 0,1M e homogeneizando-se com auxílio de uma alça de Drigalski. A concentração das suspensões foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{550} = 1,0$, o que se aproxima a 10^9 células bacterianas por ml de suspensão.

Mudas de tomate cv Santa Cruz Kada obtidas conforme item 2.2.1, com mesmo padrão de desenvolvimento, foram selecionadas e retiradas da areia com máximo cuidado para não terem suas raízes danificadas. Em seguida, fez-se a bacterização das raízes distribuindo as mudas dentro de uma placa de Petri esterilizada contendo a suspensão bacteriana. Nessa suspensão as raízes foram imersas por dez minutos, e a seguir transplantadas para bandejas de tubetes contendo substrato Plantmax.

Utilizou-se a mesma metodologia nos dois experimentos montados, tendo 4 repetições por isolado bacteriano. No primeiro experimento cada repetição foi constituída de parcelas de duas plantas e no segundo de três plantas. O tratamento testemunha nos dois experimentos constituíram-se sempre de plântula sem bactéria. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, tendo as médias de cada tratamento agrupadas pelo teste de Scott & Knott (Scott e Knott, 1974), em nível de 5% de significância. Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

2.2.3 - Obtenção de *Meloidogyne javanica* e inoculação.

Ovos empregados como inóculo de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, foram obtidos de plantas de tomate cv. 'Santa Cruz Kada' mantidas em casa de vegetação. Para isso as raízes galhadas de tomate foram lavadas cuidadosamente em bandeja contendo água de torneira, em seguida,

cortadas em pedaços de 2 cm de comprimento e agitadas com auxílio de um liquidificador em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto. Após essa operação a suspensão de raízes e ovos foi vertida em um conjunto de peneiras de 0,075mm sobre 0,038mm. O material retido na peneira de 0,038mm foi coletado num copo com auxílio de um pisseta (Hussey e Barker, 1973). A suspensão de ovos obtida foi quantificada e ajustada para 200 ovos/ml com o uso de estereoscópico.

Dez dias após o transplante das mudas de tomate bacterizadas como descrito em 2.2.2 para a bandeja de tubetes, inocularam-se 400 ovos de *Meloidogyne javanica* em cada planta de tomate. A inoculação foi feita com auxílio de pipeta e bastão de vidro. Para isso foram feitos dois orifícios em volta de cada muda e então, adicionado 2 ml da suspensão de ovos.

2.3 Época de avaliação e parâmetros avaliados

Trinta dias após a inoculação dos ovos de *Meloidogyne javanica*, fez-se a avaliação do experimento. Cada planta foi retirada cuidadosamente dos tubetes e cortada na altura do coleto para separar a parte aérea das raízes. A altura da parte aérea foi medida com auxílio de uma régua graduada e acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa à 50°C. A secagem foi feita por 24 horas e após o resfriamento foi pesada em balança eletrônica.

As raízes foram imersas em solução de floxina B a 0,0015% durante 20 minutos de forma a facilitar a visualização das galhas as quais foram contadas empregando-se um contador manual e lupa. Todo o sistema radicular foi cortado em pedaços de 0,5cm de comprimento e extraído ovos pela técnica de Hussey e Barker (1973) e quantificados conforme descrito no item 2.2.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 130 isolados bacterianos, da rizosfera de diversas plantas (TABELA 2), selecionados entre as colônias bacterianas que apareceram em maior quantidade. Desses, 66 isolados foram testados, no experimento 1 (TABELA 3). Nenhum deles reduziu significativamente o número de galhas por grama de raiz em comparação com a testemunha (TABELA 4). Porém, 28 isolados (42,42%) tiveram um efeito contrário estimulando a formação de galhas nas raízes quando comparados com a testemunha. Observou-se a redução da matéria seca em 31 isolados o que representa (46,96%) dos isolados testados (TABELA 4) quando comparados com a testemunha. O número de ovos por grama de raiz foi maior do que a testemunha na maioria dos isolados testados (TABELA 4). Em sete deles o número de ovos por grama de raiz não diferenciou significativamente da testemunha. Talvez a baixa eficiência de muitos isolados bacterianos nesse experimento no controle de nematóides nas raízes do tomateiro pode ser devido ao baixo crescimento da raiz reduzindo a rizosfera da planta importante na sobrevivência da bactéria e a ausência de bactérias eficazes nas rizosferas amostradas dos municípios de Ribeirão Vermelho e Lavras (Serrinha). Schroth e Hancock (1981) constataram que são poucos os isolados de rizobactérias eficazes na redução populacional e galhas de *Meloidogyne*, podendo em alguns casos constituir em menos de 10% dos isolados obtidos.

A redução do teor de matéria seca em alguns isolados (TABELA 4), pode talvez ser explicada pela ocorrência de bactérias fitopatogênicas. Também a ocorrência de rizobactérias não fitopatogênicas mais prejudiciais ao desenvolvimento das plantas pode ter aparecido entre alguns isolados bacterianos usados nesse experimento. Segundo Luz (1996) e Schippers, Bakker e Bakker,

(1987), além de benéficas às plantas as rizobactérias podem também ser prejudiciais ou neutras.

TABELA 2 - Isolados bacterianos e as respectivas plantas hospedeiras

Plantas hospedeiras	Locais de coleta	Isolados
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	Ijaci , Lavras (Serrinha) e	37
Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Ribeirão Vermelho	14
Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	11
Cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	5
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Ijaci	21
Pimentão (<i>Capiscum annuum</i> L.)	Ribeirão Vermelho	9
Beringela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Serrinha	9
Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	9
Cravo de defunto (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	4
Labiab (<i>Dolichos labiab</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	4
Capuchinha (<i>Trapaeeolum majus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	7
Total		130

TABELA 3 - Isolados bacterianos com as respectivas rizosferas e os locais de coleta avaliados no primeiro experimento.

Plantas hospedeiras	Locais de coleta	Isolados
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	Ribeirão Vermelho	20
Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	10
Capuchinha (<i>Trapaeolum majus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	7
Cravo de defunto (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	4
Cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	4
Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	7
Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Ribeirão Vermelho	14
	Total	66

TABELA 4 - Efeito de isolados bacterianos da rizosfera do primeiro experimento no número de galhas e ovos por grama de raiz e no peso em gramas (g) da matéria seca da parte aérea do tomateiro.

Nº de Ordem	Código dos Isolados	Número de galhas/g de raiz	Número de ovos/g de raiz	Peso da matéria seca em gramas
1	TEST	31,98 c	775, 65 g	0, 9575 a
2	CPX CA 11	14, 79 c	1607, 5 e	1, 06 a
3	TO RB 11	16, 88 c	1788, 26 e	0, 8775 a
4	MAM CA 5	21, 69 c	1095, 55 f	0, 72 b
5	CPX CA 78	14, 46 c	*	0, 9125 a
6	MAM CA 4	21, 88 c	1147, 6675 f	1, 17a
7	CAF CA 78	18, 79 c	*	*
8	CPX CA 40	21, 76 c	990, 91 f	1, 055 a
9	CAF CA 28	23, 35 c	815, 615 g	0, 6825 b
10	TAG CA 00	19,55 c	*	*
11	TO RB 12	23,24 c	1288,485 f	0,6275 b
12	TAG CA 63	23, 76 c	1645, 19 e	1, 035 a
13	CPX CA 61	24, 15 c	*	0,67 b
14	FEJ RB 42	24, 74 c	620, 46 g	0, 54 b
15	MAM CA 8	25, 05 c	1757, 67 e	0, 7375 b
16	TO RB 15	25,23 c	1491, 465 e	*
17	QUI CA 45	25, 68 c	659, 93 g	0, 705 b
18	QUI CA 44	26,31 c	1803, 722 e	0,8425 a
19	TO RB 35	30, 26 c	*	0, 77 b
20	TO RB 75	25, 85 c	4121, 582 c	0, 74 b
21	MAM CA 2	21, 41 c	1272, 79 f	*
22	TO RB 47	28, 67 c	1248, 48 f	1, 3025 a

“.....continua.....”

"TABELA 4, Cont."

23	TO RB 1	29, 74 c	*	*
24	TO RB 14	28, 85 c	1319, 7375 f	0, 97 a
25	TO RB 10	31, 31 c	*	0,7975 a
26	TO RB 51	31, 25 c	1297, 53 f	0, 605 b
27	TO RB 13	33, 54 c	1995, 322 e	0,86 a
28	MAM CA 7	31, 85 c	634, 13 g	0, 8225 a
29	FEJ RB 29	32, 51 c	2013, 392 e	0,49 b
30	QUI CA 40	33,16 c	1359, 642 e	1, 065 a
31	FEJ RB 28	33, 97 c	998, 785 f	0, 6575 b
32	TO RB 23	35, 76 c	1562, 655 e	0, 8525 a
33	QUI CA 74	35, 21 c	*	*
34	CPX CA 66	38, 04 c	1651, 76 e	0, 987 a
35	FEJ RB 27	37, 39 c	1300, 8225 f	0, 65 b
36	TO RB 16	38,36 c	*	0,5525 b
37	FEJ RB 39	39, 13 c	1095, 675 f	*
38	TO RB 25	40, 125 c	1423, 08 e	0, 79 a
39	QUI CA 43	44, 09 b	952, 02 f	0, 5475 b
40	QUI CA 53	45, 98 b	*	0, 875 a
41	FEJ RB 26	45, 19 b	*	0, 7925 a
42	FEJ RB 40	49, 26 b	316, 64 g	0, 69 b
43	FEJ RB 43	46, 99 b	1119, 31 f	0, 545 b
44	TAG CA 31	46, 21 b	2263, 107 e	1, 095 a
45	FEJ RB 31	48, 88 b	3516, 72 d	0, 3875 b
46	CAF CA 6	47, 99 b	1505, 962 e	0, 7425 b
47	QUI CA 54	50, 24 b	2530, 38 e	0, 94 a
48	FEJ RB 30	52, 7 b	*	*
49	TO RB 18	54, 98 b	1749, 625 e	0, 8575 a

".....continua....."

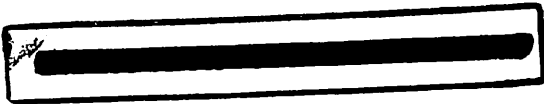
"TABELA 4, Cont."

50	TO RB 49	51, 37 b	3460, 562 d	0, 9575 a
51	QUI CA 00	55, 25 b	*	*
52	TAG CA46	55, 66 b	*	*
53	QUI CA 23	56, 3 b	1623, 15 e	1, 0175 a
54	TO RB 9	59, 27 b	*	0, 525 b
55	FEJ RB 38	59, 03 b	2954, 965 d	1, 1375 a
56	FEJ RB 34	61, 68 b	2043, 557 e	0, 605 b
57	TO RB 12	65, 44 b	*	0, 6275 b
58	CPX CA 44	66, 57 b	2426, 355 e	0, 745 b
59	QUI CA 46	72, 64 b	*	0, 5125 b
60	MAM CA 1	69, 37 b	3004, 825 d	0,6375 b
61	FEJ RB 32	70, 1 b	4465, 837 c	0, 725 b
62	CPX CA 8	73, 52 b	*	*
63	FEJ RB 36	77, 36 a	10114, 42 a	0, 665 b
64	TO RB 21	97, 62 a	*	0, 715 b
65	MAM CA 6	103, 46 a	5192, 682 c	0,3975 b
66	TO RB 19	114, 26 a	6718, 602 b	0,6725 b
67	CAF CA 8	*	*	0, 7 b

Medias seguidas por letras distintas, diferem-se entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

(*) - Dado não analisado estatisticamente devido ao pequeno número de repetições.

No segundo experimento, dos 64 isolados testados (TABELA 5), a maioria reduziu o número de galhas e ovos por grama de raiz, e aumentou a matéria seca, quando comparados com a testemunha (TABELA 6). De fato, trinta e dois isolados (50%) reduziram o número de galhas por grama de raiz quando comparados com a testemunha (TABELA 6). Essa redução variou de 17,38% a



45,09%. Quarenta e sete isolados, foram eficientes na redução do número de ovos por grama de raiz (73,43 %), quando comparados com a testemunha e apenas três isolados (4,68 %) aumentaram o número de ovos/g de raiz (TABELA 6). Essa redução variou de 40,32% a 100%. Trinta e um isolados aumentaram o teor da matéria seca do tomateiro quando comparados com testemunha, cujo aumento variou de 42,64% a 76,64%. Observou-se ainda que mesmo havendo número expressivo de galhas, ocorreu a redução do número de ovos chegando a zero em alguns isolados testados (TABELA 6). Talvez alguns isolados inibiram ou retardaram a eclosão de juvenis ou mesmo a bactéria deve ter destruída a substância produzida pela raiz e que atrai o nematóide para a ponta da raiz, como também postulados por Oostendorp e Sikora (1990).

TABELA 5 - Isolados bacterianos com as respectivas rizosferas e os locais de coleta avaliados no segundo experimento.

Hospedeira	Locais de coleta	Isolados
Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Lavras (Serrinha) e Ijaci	17
Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Ijaci	21
Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Ribeirão Vermelho	9
Beringela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Lavras (Serrinha)	9
Cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	1
Lablab (<i>Dolichos lablab</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	4
Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	2
Quiabo (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)	1
Total		64

TABELA 6 - Efeito de isolados bacterianos da rizosfera do segundo experimento no número de galhas e ovos por grama de raiz e no peso em gramas (g) da matéria seca da parte aérea do tomateiro.

Nº de Ordem	Código dos isolados	Número de galhas/g de raiz	Número de ovos/g de raiz	Peso da matéria seca em gramas
1	TEST	71, 69 a	324, 1675 d	0, 195 d
2	ALF IJAC 164	*	100, 465 g	0, 0775 e
3	ALF IJAC 123	*	0 i	0, 0775 e
4	TO IJAC 170	*	*	0, 08 e
5	LAB CA 1	34, 78 b	888, 91 b	0, 095 e
6	PIM SER 141	*	*	0, 1075 e
7	ALF IJAC 131	*	*	0, 125 e
8	BE SER 168	56, 47 a	*	0, 17 d
9	PIM SER 148	46, 21 b	0 i	0, 1775 d
10	BE SER 166	36, 31 b	77, 39 h	0, 1925 d
11	ALF IJAC 145	67, 96 a	0 i	0, 197 d
12	ALF IJAC 120	46, 13 b	76, 6025 h	0, 205 d
13	TO IJAC 1	53, 34 a	0 i	0, 2175 d
14	BE SER 159	56, 21 a	192, 1425 e	0, 23 d
15	LAB CA 112	*	51, 685 h	0, 23 d
16	ALF IJAC 167	90, 9 a	158, 555 f	0, 2325 d
17	LAB CA 183	31, 05 b	125, 9375 f	0, 2325 d
18	BE SER 118	*	*	0, 2375 d
19	BE SER 160	75, 69 a	309, 0875 d	0, 235 d
20	BE SER 146	*	0 i	0, 2375 d
21	PIM SER 167	62, 95 a	106, 005 g	0, 2425 d
22	ALF IJAC 116	23, 6 b	58, 71 h	0, 25 d

“.....continua.....”

“TABELA 6, Cont.”

23	TO IJAC 135	27, 43 b	119, 8 g	0, 255 d
24	TO IJAC 133	102, 15 a	*	0, 2675 d
25	ALF IJAC 138	26, 47 b	*	0, 275 d
26	QUI CA 26	*	*	0, 2829 d
27	ALF IJAC 122	*	0 i	0, 2825 d
28	BE SER 154	46, 06 b	0 i	0, 3025 d
29	ALF IJAC 144	35, 68 b	0 i	0, 305 d
30	TO SER 147	117, 22 a	0 i	0, 31 d
31	ALF IJAC 140	26, 55 b	*	0, 325 c
32	BE SER 165	119, 74 a	193, 4775 e	0, 34 c
33	LAB CA 130	28, 7 b	146, 5975 f	0, 345 c
34	PIM SER 153	59, 21 a	42, 695 h	0, 3475 c
35	CAF CA 62	68, 2 a	26, 025 h	0, 36 c
36	BE SER 151	31, 54 b	0 i	0, 37 c
37	PIM SER 157	42, 87 b	15, 94 i	0, 37 c
38	TO IJAC 127	21, 41 b	0 i	0, 38 c
39	ALF IJAC 119	*	0 i	0, 3825 c
40	PIM SER 155	46, 71 b	94, 76 g	0, 39 c
41	TO IJAC 163	37, 93 b	57, 1 h	0, 3975 c
42	PIM SER 152	49, 95 b	43, 82 h	0, 395 c
43	ALF IJAC 169	*	87, 14 g	0, 4075 c
44	ALF IJAC 142	44, 31 b	*	0,41 c
45	TO IJAC 143	60, 67 a	0 i	0, 41 c
46	ALF IJAC 124	27, 38 b	0 i	0, 4275 c
47	TO IJAC 128	31, 98 b	*	0, 43 c
48	TO SER 156	44, 69 b	0 i	0, 4375 c
49	TO IJAC 01	*	*	0, 4375 c

“.....continua.....”

“TABELA 6, Cont.”

50	ALF IJAC 117	42, 87 b	1416, 13 a	0, 445 c
51	TO IJAC 136	29, 43 b	0 i	0, 45 b
52	ALF IJAC 137	25, 66 b	0 i	0, 4525 b
53	ALF IJAC 118	*	0 i	0, 4575 b
54	MAM CA 70	40, 88 b	61, 3975 h	0, 4675 b
55	TO SER 158	24, 94 b	0 i	0, 4625 b
56	TO IJAC 130	48, 91 b	43, 5475 h	0, 475 b
57	MAM CA 73	23, 16 b	65, 555 h	0, 45 b
58	PIM SER 162	40, 72 b	36, 985 h	0, 5 b
59	ALF IJAC 010	*	*	0, 4975 b
60	ALF IJAC 166	39, 34 b	61, 15 h	0, 5525 b
61	ALF IJAC 132	28, 55 b	38, 79 h	0, 835 a
62	TO IJAC 111	*	*	0, 3025 d
63	PIM SER 158	*	0 i	*
64	TO IJAC 147	*	0 i	*
65	TO IJAC 138	*	0 i	*

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

(*) - Dado não analisado estatisticamente devido ao pequeno número de repetições.

Dos isolados testados (TABELA 2), 53 deles demonstraram antagonismo a *Meloidogyne javanica*, correspondendo a 40,76 % dos isolados avaliados (TABELA 7). Esse valor foi bem superior aquele encontrado por Habe (1997) e Zavaleta-Meija e Van Gundy (1982), em que aproximadamente 10% dos isolados bacterianos da rizosfera tiveram efeito na redução populacional de *Meloidogyne incognita*, ou no número de galhas. Entretanto, utilizou-se neste trabalho rizosfera de diversas plantas (TABELA 2), concorrendo talvez para

aumentar as chances de isolar bactérias mais eficazes contra *Meloidogyne javanica*. O substrato Plantimax talvez tenha evitado competições com outras bactérias favorecendo os antagonistas de nematóides, o que não aconteceu com Habe (1997) que usou solo.

Entretanto, apenas 32 isolados reduziram o número de galhas, isto devido, talvez, ao efeito direto da bactéria ou de seus produtos na eclosão de juvenis, ou na penetração. Esses produtos da bactéria podem também ser tóxicos ou ter efeitos enzimáticos sobre a cutícula do nematóide (Dollfus, 1946; Jatala, 1985). Katznelson (1946), demonstrou “in vitro” a ação lítica de três isolados de mixobactérias do solo e de seus concentrados enzimáticos extra-celulares sobre nematóides bacteriófagos.

O número de ovos pode também ter sido afetada pelos eventos pós penetração e da reprodução, obtendo-se assim maior número de isolados que reduziu o número total de ovos. Habe (1997), observou que de 156 isolados bacterianos oriundos da rizosfera de plantas solanáceas do cerrado de Goiás (Brasil), testados em ovos de *Meloidogyne incognita* raça 1 “in vitro”, 50% desses, apresentaram alguma característica ovicida, inibindo a eclosão entre 0,47 à 11,3%, quando comparados com a testemunha. Por outro lado foi ainda mais reduzido o número de isolados que promoveram o crescimento das plantas, apenas 31 (23,84%) de 130 isolados testados (TABELA 5). Isto já tem sido constatado por vários autores. Sikora (1988), também encontrou um número reduzido de isolados bacterianos com a capacidade de estimular o crescimento de plantas. De um total de isolados bacterianos obtidos e testados na rizosfera da beterraba contra o nematóide *Heterodera schachtii*, apenas 5,2% estimularam o desenvolvimento das plantas em casa de vegetação, aumentando a matéria seca. Esse número foi maior, chegando a 25% quando testou-se contra o nematóide *Globodera pallida*, isolados bacterianos obtidos da rizosfera da batata, também

em casa de vegetação. Nesse trabalho, a maioria dos isolados bacterianos que aumentaram o teor matéria seca do tomateiro quando comparados com a testemunha (TABELA 7), também reduziram o número de galhas nas suas raízes. Isso comprova as afirmações de Luz (1996), de que às rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP), além de poderem agir diretamente através da síntese de fitohormônios como às auxinas ou outros mecanismos, podem também agir indiretamente realizando o controle biológico de patógenos no solo.

Embora não fora verificado a presença das bactérias no interior da planta, é possível que alguns dos isolados selecionados possam estar atuando de modo endofítico, e assim estejam afetando o parasitismo do nematóide, pois a metodologia adotada para obtenção dos isolados candidatos não permitia a distinção entre as rizobactérias epifíticas das endofíticas.

TABELA 7 - Seleção dos melhores isolados com efeito significativo na redução de galhas por gramas de raiz, ovos por grama de raiz ou no aumento da matéria seca da parte aérea do tomateiro quando comparados com a testemunha (X).

nº de ordem	Isolado	Redução de galhas/ g de raiz	Redução de ovos/ g de raiz	Aumento do teor de matéria seca
1	ALF IJACI 117	X	-	X
2	BE SER 151	X	X	X
3	ALF IJAC 137	X	X	X
4	TO SER 156	X	X	X
5	TO IJAC 136	X	X	X
6	PIM SER 155	X	X	X
7	PIM SER 148	X	X	-
8	ALF IJAC 166	X	X	X
9	BE SER 154	X	X	-
10	ALF IJAC 124	X	X	X
11	TO IJAC 163	X	X	X
12	TO IJAC 127	X	X	X
13	PIM SER 157	X	X	X
14	ALF IJAC 118	-	X	X
15	ALF IJAC 132	X	X	X
16	ALF IJAC 140	X	-	X
17	LAB CA 130	X	X	X
18	MAMO CA 73	X	X	X
19	LAB CA 183	X	X	-
20	ALF IJAC 142	X	-	X

“.....continua.....”

"TABELA 7, Cont."

21	TO IJAC 135	X	X	-
22	ALF IJAC 144	X	X	-
23	ALF IJAC 138	X	-	-
24	BE SER 166	X	X	-
25	MAM CA 70	X	X	X
26	PIM SER 162	X	X	X
27	LAB CA 1	X	-	-
28	PIM SER 152	X	X	X
29	TO IJAC 128	X	-	X
30	ALF IJAC 120	X	X	-
31	TO SE 158	X	X	X
32	TO IJAC 130	X	X	X
33	ALF IJAC 122	-	X	-
34	QUI CA 26	-	X	-
35	ALF IJAC 123	-	X	-
36	TO IJAC 143	-	X	X
37	ALF IJAC 119	-	X	X
38	LAB CA 112	-	X	-
39	TO IJAC 1	-	X	-
40	ALF IJAC 145	-	X	-
41	BE SER 165	-	X	X
42	ALF IJAC 164	-	X	-
43	ALF IJAC 01	-	-	X
44	ALF IJAC 169	-	X	X
45	ALF IJAC 167	-	X	-
46	TO IJAC 138	-	X	-
47	TO IJAC 147	-	X	-

".....continua....."

“TABELA 7, Cont.”

48	PIM SER 167	-	X	-
49	ALF IJAC 116	X	X	-
50	BE SER 159	-	X	-
51	PIM SER 153	-	X	X
52	BE SER 146	-	X	-
53	TO IJAC 01	-	-	X
54	CAF CA 62	-	X	X
55	PIM SER 158	-	X	-

Isolados bacterianos identificados com código, cujas iniciais representam a planta hospedeira e o local de coleta seguido do número de ordem.

(-) efeito não significativo.

Da rizosfera de algumas plantas estudadas, isolaram-se bactérias antagonistas à *Meloidogyne javanica*, porém em porcentagens diferentes, com destaque para alface e tomate com 35% e 23%, respectivamente, de ocorrências de antagonistas (FIGURA 1). Essa elevada porcentagem para uma única planta, talvez tenha sido devido ao maior número de isolados obtidos dessas plantas (TABELAS 2 e 5). Mas mesmo assim parece predominar o número de antagonistas na rizosfera dessas plantas devido talvez ao uso mais intensivo de material orgânico no cultivo desses vegetais.

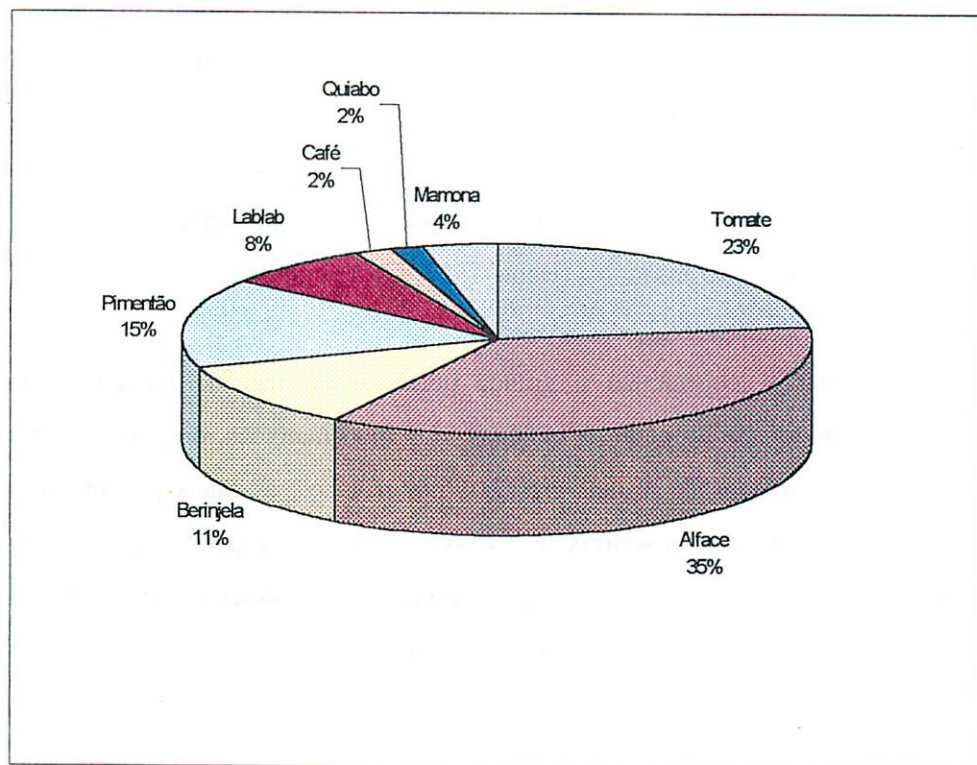


FIGURA (1)- Porcentagem de isolados bacterianos antagonicos a *Meloidogyne javanica* nas diversas plantas estudadas.

Realizou-se apenas um fase de seleção em cada experimento. Nova seleção dentre os isolados que demonstraram antagonismo à *Meloidogyne javanica*, poderia reduzir o número de isolados como encontrado por Habe (1997). Esse autor, testou isolados de rizobactérias obtidas da rizosfera de espécies de plantas solanáceas do cerrado do estado de Goiás (Brasil) em *Meloidogyne incognita* raça 1, encontrando cerca de 10,3% de bactérias eficientes numa primeira avaliação, sendo que numa segunda realizada com os

melhores isolados da primeira esse número caiu para 3,8%. Redução do número de isolados bacterianos da rizosfera antagonistas a fitonematóides também ocorreu com Racke e Sikora (1992).

Outra possibilidade para trabalhos futuros com rizobactérias, seria a aplicação simultânea de dois ou mais isolados na mesma planta como já realizados por vários pesquisadores (Habe, 1997; Gokte e Swarup, 1988 e Snell et al., 1978).

Entretanto, constata-se o grande potencial do uso de bactérias da rizosfera como agente do controle biológico dos fitonematóides, particularmente com bactérias isoladas de plantas crescidas nos trópicos, as quais poderão ser melhor exploradas em pesquisas no Brasil. Porém avanços precisam ser alcançados na metodologia de inoculação e no estudo da associação de isolados introduzidos artificialmente numa mesma rizosfera.

4 CONCLUSÕES

- 1 - Quarenta por cento dos isolados bacterianos obtidos da rizosfera de diversas plantas reduziram o ataque de *Meloidogyne javanica* às raízes do tomateiro.
- 2 - O maior número de isolados bacterianos que demonstraram controlar o nematóide, foi obtido da rizosfera da alface e do tomate.

5 LITERATURA CITADA

- CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. In: LUZ, W.C. DA; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo : RAPP, 1988, p.285-327.
- DOLLFUS, R.P. Parasites des helminthes. In: DOLLFUS, R.P. (eds.). **Encyclopedie Biologique**, Paris: P. Lechevalier, 1946. v. 27. p. 482.
- GOKTE, N.; SWARUP, G. On the association of bacteria with larvae and galls of *Anguina tritici*. **Indian Journal Nematology**, New Delhi, v. 18, p. 313-318, 1988.
- HABE, M.H. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP - no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro. Brasília: UNB, 1997. 109p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.57, n.12, p. 1025 - 1028, 1973
- JATALA, P. Biological control of nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C. **An advanced treatise on Meloidogyne, biology and control**. North Carolina, North Carolina State Graphics, v.1, p. 303-308, 1985.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective medium for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60,p.969-967,1970.
- KATZNELSON, H. The rizosphere effect of managels on certain groups of soil microorganisms. **Canadian Journal . J. Res**, v.21, p. 343-349, 1946.

- KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. **Plant growth-promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers.** In: *The Rhizosphere and Plant growth.* Eds. D. L. Keister and P. B. Cregan. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990. p. 315-326.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. In: LUZ, W.C. DA; FERNANDES, J.M. ; PRESTES, A.M. ; PICININI, E.C. (Eds). *Revisão Anual de Patologia de Plantas.* Passo Fundo: RAPP, 1996. p.1-49.
- RACKE, J.; SIKORA, R.A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Soil Biology & Biochemistry*, Great Britain, v. 24, n.6, p. 521-526, 1992.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.35, p. 453-476, 1981.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v.30, p. 507-512, Sept. 1974.
- SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv, Bonn*, v.2, n.53, p. 867-878, 1988.
- SIKORA, R. A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v..30, p. 245-270.1992.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.25, p. 339-358, 1987.
- SCHÖNBECK, F.; KLINGAUF, F.; KRAUS, P. Situation, aufgaben und perspektiven des biologischen pflanzenschutzes. *Gesunde Pflanzen*, Bonn, v.40, p.86-96, 1988.

SNELL, K.; HOLDER, Z. A.; LEPLA, S.; SAELINGER, C. B. Role of exotoxin and protease as possible virulent factors in experimental infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, v.19, p. 839, 1978.

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

ANEXOS

Quadro 1A. Resumo da análise de variância sobre o efeito das rizobactérias no número de galhas/ g de raiz do tomateiro do primeiro experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	65	562,0628	8,76471	5,49 **
Resíduo	198	311,7604	1,5745	
Total	263	873,8232		

C.V. = 20,02

Média Geral = 6,2681

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Quadro 2A. Resumo da análise de variancia sobre o efeito das rizobactérias no teor de matéria seca do tomateiro no primeiro experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	63	1,8853	0,0299	2,26 **
Resíduo	192	2,5411	0,0132	
Total	255	4,4263		

C.V. = 10,16

Média Geral = 1,1326

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Quadro 3A. Resumo da análise de variância do efeito das rizobactérias no número de ovos/g de raiz no primeiro experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	53	44640,8703	842,2806	18,32 **
Resíduo	162	7446,4085	45,9655	
Total	215	52087,2788		

C.V. = 16,03

Média Geral = 42,3057

Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

Quadro 4A. Resumo da análise de variância do efeito das rizobactérias no número de galhas/ g de raiz no segundo experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	49	363,2834	7,4139	2,53 * *
Resíduo	150	439,2822	2,9285	
Total	199			

C.V. = 25,57

Média Geral = 6,6922

Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$

Quadro 5 A. Resumo da análise de variância do efeito das rizobactérias no teor de matéria seca do tomateiro no segundo experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	61	1,3661	0,0224	9,37 * *
Resíduo	186	0,4447	0,0224	
Total	247	1,8108		

C.V. = 5,41

Média Geral = 0,9035

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Quadro 6A. Resumo da análise de variância do efeito das rizobactérias no número de ovos/g de raiz do segundo experimento.

Fontes de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	53	11972,4727	225,8957	90,93 * *
Resíduo	162	402,4564	2,4843	
Total	215	12374,9291		

C.V. = 23,41

Média Geral = 6,7342

Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

CAPITULO 3

ISOLAMENTO E PARASITISMO DE FUNGOS DE FÊMEAS DE *Meloidogyne javanica* e *M. exigua*.

RESUMO

COIMBRA, João Luiz. Isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne javanica* e *M. exigua*. In: _____. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*, isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 1998. Cap.3, p. 62-76 (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) *

Trinta isolados fúngicos foram obtidos externa e internamente ao corpo de fêmeas de *Meloidogyne javanica* e *M. exigua*, e identificados como: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Paecilomyces variotii*, *P. lilacinus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Verticillium* sp. e *Curvularia* sp. O gênero *Fusarium* foi o que mais predominou entre os isolados, sendo às espécies *F. solani* e *F. oxysporum* as mais frequentes. Testes “in vitro” foram realizados para observação do parasitismo dos fungos *Paecilomyces lilacinus* (4 isolados), *P. variotii* (1 isolado), *Aspergillus ochraceus* (1 isolado), *Penicillium* sp. (1 isolado), *Verticillium* sp. (1 isolado), *F. oxysporum* (3 isolados) e *Fusarium* sp. (8 isolados), em fêmeas de *Meloidogyne javanica*. Todos os isolados demonstraram alta capacidade de parasitismo de fêmeas de *M. javanica*, “in vitro”, demonstrando que o corpo da fêmea constitui boa fonte nutricional para esses fungos.

*Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador), Ricardo Magela de Souza – UFLA e Romildo da Silva – UFLA

ABSTRACT

COIMBRA, João Luiz. Isolation and parasitism of *Meloidogyne javanica* and *M. exigua* female fungi. In: _____. Antagonistic rhizobacteria to *Meloidogyne javanica*, isolation and parasitism of *Meloidogyne* spp. female fungi. Lavras: UFLA, 1998. Cap.2, p. 62-76 (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

Thirty fungal isolates were obtained from internal and external *Meloidogyne javanica* and *M. exigua* females bodies, and identified, as: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Paecilomyces variotti*, *P. lilacinus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Verticillium* sp. and *Curvularia* sp. Among the isolates *Fusarium*, *F. solani* and *F. oxysporum* were the most frequent genus and species, respectively. "In vitro" parasitism tests were done using *P. lilacinus* (4 isolates), *Aspergillus ochraceus* (1 isolate), *Penicillium* sp. (1 isolate), *Verticillium* sp. (1 isolate), *F. oxysporum* (3 isolates) and *Fusarium* sp. (8 isolates) inoculated on *Meloidogyne javanica* female bodies. All fungus isolates parasitized *Meloidogyne javanica* females.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos (Major Professor), Ricardo Magela de Souza - UFLA and Romildo da Silva - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Fungos de solo parasitam e predam vários estádios do ciclo de vida dos nematóides sedentários (Kerry e Mullen, 1981), tornando assim antagonistas de importantes fitonematóides (Ribeiro e Campos, 1993; Naves e Campos, 1991; Silva e Campos, 1991; Costa e Campos, 1997).

A exposição de parte do corpo macio e desenvolvido das fêmeas de *Meloidogyne* spp., tornam esses nematóides vulneráveis ao ataque de fungos e bactérias (Morgan-Jones e Rodriguez-Kabana, 1985). São poucos os relatos sobre a ocorrência de fungos parasitas facultativos e obrigatórios em fêmeas de *Meloidogyne*. Santos, Ferraz e Muchovej (1991), isolaram alguns fungos chamados de oportunistas, oriundos de raízes galhadas, porém colonizando massa de ovos de fêmeas de *Meloidogyne*. Dentre eles, destacam-se *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium equiseti*, *F. solani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium* spp., *P. decubens* e *Trichoderma harzianum*. Porém não foi testado o parasitismo deles em fitonematóides. Morgan-Jones e Rodriguez-Kabana (1980), descreveram o fungo *Verticillium chlamydosporium* como parasito de fêmeas maduras de *Meloidogyne arenaria*. *Nematophthora gynophila* tem sido encontrado parasitando fêmeas de *Meloidogyne acronea* (Kerry e Crump, 1977).

Existem muitos microorganismos que parasitam fêmeas de *Meloidogyne* spp. (Freire e Bridge, 1985). Esses, contudo, também podem promover a degradação do seu corpo tornando assim organismos de importância no controle biológico do nematóide das galhas. Desta forma, objetivou-se neste trabalho:

- Isolar e identificar os fungos associados tanto externamente como internamente a fêmeas de *Meloidogyne* spp.

- Testar "in vitro" o parasitismo de fungos isolados em fêmeas de *Meloidogyne javanica*.

2 METODOLOGIA

2.0 Local de coleta e obtenção de fêmeas de *Meloidogyne* spp.

Amostras de raízes de plantas de café (*Coffea arabica* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.) e batata baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) infestadas pelo nematóide das galhas *Meloidogyne* spp., foram coletadas de diversas localidades (TABELA 8) e acondicionadas em sacos plásticos umedecidos, para impedir o ressecamento, e conduzidas ao laboratório, para posterior extração das fêmeas. No laboratório as raízes galhadas foram lavadas em água corrente de forma a eliminar as partículas de solo. Com o uso de microscópio estereoscópico e estilete, as fêmeas foram cuidadosamente retiradas das galhas e transferidas para um placa de Petri contendo água destilada esterilizada para posterior isolamento de fungos.

TABELA 8 - Procedência das amostras empregadas no isolamento de fungos de fêmeas de *Meloidogyne* spp.

Planta hospedeira	Locais de coleta
Café (<i>Coffea arabica</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill)	Ijaci e Lavras (Campus da UFLA)
Batata Baroa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft)	Ijaci
Berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Lavras (Serrinha)
Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	Lavras (Campus da UFLA)

2.1 Isolamento e identificação de fungos

Quatro fêmeas de *Meloidogyne* spp. foram colocadas equidistantemente em placas contendo ágar-água 2%, acrescido do antibiótico estreptomicina na concentração de 100ug/ ml, por quadrante, desenhado no fundo da placa através de uma caneta dermatográfica. A seguir, às placas foram fechadas, vedadas com rolopack e levadas para câmara de incubação (BOD), onde foram mantidas à temperatura constante de 25°C, durante o período de dez dias. As colônias fúngicas crescidas sobre as fêmeas, foram repicadas cuidadosamente com auxílio de um estilete flambado para placas de Petri com o meio de batata, dextrose e agar (BDA). Após sucessivas repicagens, obtiveram-se culturas puras para a identificação desses fungos.

Para o isolamento de fungos dos tecidos internos, às fêmeas foram desinfestadas superficialmente colocando-as em solução de cloreto de mercúrio (HgCl_2) a 0,02% durante 40 segundos, seguido-se de 3 lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Na câmara de fluxo laminar, essas três fêmeas foram colocadas no interior de um tubo de ensaio esterilizado contendo 2 ml de água destilada esterilizada. Em seguida, foram esmagadas através da introdução de outro tubo de ensaio de menor diâmetro no interior do tubo onde se encontravam às fêmeas. Após essa operação, retiraram-se do interior do tubo três alíquotas de 0,1ml com auxílio de uma pipeta esterilizada, as quais foram distribuídas e espalhadas com uma alça de Drigalski em uma placas de Petri contendo o meio BDA acrescido do antibiótico estreptomicina na concentração de 100ug/ ml. À placa foi então fechada, vedada com rolopake, levada para uma câmara de incubação, e mantida à temperatura 25°C. As colônias fúngicas que apareceram na placa foram repicadas sucessivamente até a obtenção de culturas puras as quais foram empregadas na identificação das espécies.

2.2 Parasitismo dos fungos isolados de fêmeas de *Meloidogyne* spp.

Foram empregadas 1000 fêmeas de *Meloidogyne javanica* extraídas, de raízes galhadas de tomateiro cv Santa Cruz Kada mantidos em casa de vegetação. Após a extração, às fêmeas foram desinfestadas com NaOCl 1% mais cloranfenicol à 100 ppm por 5 minutos, plaqueadas em BDA e incubadas em câmara de crescimento BOD a 25 °C por 48 horas. Aquelas sem contaminação por fungos e bactérias foram usadas no teste de parasitismo dos fungos isolados conforme descrito em 2.1.

Foram avaliados inicialmente 19 isolados fúngicos no teste de parasitismo em fêmeas de *Meloidogyne javanica*. Para isto, dez fêmeas foram colocadas em cada uma das 5 placas de Petri contendo ágar-água 2%. Em quatro delas foi colocado um disco de 5mm de diâmetro do fungo a ser testado retirado das bordas da colônias com 15 dias de crescimento em meio BDA a 25 °C. À quinta placa foi usada como testemunha, sendo então, colocado um disco de BDA sem o fungo. Às placas foram fechadas com rolopack e incubadas por 12 dias, em câmara de incubação sob o regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro à temperatura de 20 °C. Após esse período, as placas foram abertas e cada fêmea foi colocada em uma lâmina escavada, na qual adicionou-se uma gota de azul de algodão para facilitar a visualização do micélio fúngico sobre a fêmea. As observações foram feitas com o auxílio de um microscópio de objetiva invertida no aumento de 1000x. Foi então avaliado o número de fêmeas de *Meloidogyne javanica*, que continham hifas fúngicas no seu corpo e calculada a porcentagem de parasitismo pelo fungo.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e identificação dos fungos

Foram obtidos 30 isolados fúngicos exógenos ou endógenos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. (TABELA 9), com predominância do gênero *Fusarium* correspondendo a 56,66% dos isolados obtidos. Das espécies identificadas predominaram *F. oxysporum* e *F. solani* seguidas de *Paecilomyces lilacinus*. *F. solani* e *F. oxysporum* predominam no solo (Nelson, 1981), o que talvez explique a alta frequência dessas espécies em fêmeas de *Meloidogyne*. O gênero *Verticillium* representou 13,33% dos isolados e *Penicillium* 6,66%. Rodriguez-Kabana (1984) e Jatala, kaltenbach e Boncagel (1979), também encontraram os fungos *P. lilacinus* e *F. oxysporum* parasitando fêmeas de *Meloidogyne*. *F. oxysporum* e *P. lilacinus* têm sido frequentemente isolados também de massa de ovos (Ribeiro e Campos, 1993; Godoy, Rodriguez-Kabana e Morgan-jones, 1983; Morgan-Jones e Rodriguez-Kabana, 1984).

Os fungos isolados interna e externamente de fêmeas de *Meloidogyne* spp. (TABELA 9) já foram também isoladas de cistos de *Heterodera glycines* (Chen et al., 1994).

TABELA 9 - Fungos isolados externa e internamente de fêmeas de *Meloidogyne* spp.

Hospedeiro (<i>Meloidogyne</i> spp.)	Regiões da fêmea para isolamento	Gênero e espécies fúngicas
<i>Meloidogyne javanica</i>	externa	<i>Fusarium solani</i> (5 isolados) <i>Verticillium</i> sp. (4 isolados) <i>Paecilomyces lilacinus</i> (2 isolados) <i>Curvularia</i> sp. (1 isolado)
	interna	<i>F. solani</i> (2 isolados) <i>Aspergillus ochraceus</i> (1 isolado)
<i>Meloidogyne exigua</i>	externa	<i>Penicillium</i> sp. (3 isolados) <i>F. oxysporum</i> (1 isolado)
	interna	<i>Fusarium</i> sp. (5 isolados) <i>F. oxysporum</i> (4 isolados) <i>P. lilacinus</i> (1 isolado) <i>P. variotti</i> (1 isolado)

3.2 Parasitismo de fungos isolados externamente e internamente em fêmeas de *Meloidogyne* spp.

O parasitismo de 19 isolados fúngicos em fêmeas de *Meloidogyne javanica* variou de 75 a 100% (FIGURA 1). Em todas as fêmeas parasitadas observaram-se hifas fúngicas crescendo tanto interna como externamente. *Fusarium oxysporum* parasitou 90 a 100% (FIGURA 1). Freire e Bridge (1985), também encontraram 100% de parasitismo de *M. incognita* com *Paecilomyces lilacinus* testado “in vitro”. Oduor-Owino e Waudu (1996), também obtiveram “in vitro” alto parasitismo de *M. javanica* com *F. oxysporum* e *P. lilacinus*. Tanto *F. oxysporum* como *P. lilacinus* são parasitas de ovos e podem alternativamente parasitar fêmeas de *Meloidogyne* (Jatala, 1986). Costa e Campos (1997), também obtiveram “in vitro”, uma alta taxa de parasitismo dos fungos *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. lilacinus* e *P. variotii* isolados de cistos de *Heterodera glycines* em fêmeas de *Meloidogyne* spp. De fato o corpo da fêmea de *Meloidogyne* parece ser ótimo substrato para esses fungos (Oduor-Owino e Waudu, 1996).

Esse parasitismo em fêmeas, pode facilitar a liberação de ovos retidos no interior das fêmeas acelerando num curto espaço de tempo a produção de inóculo ou, na ausência do hospedeiro, acelerando o declínio populacional desses nematóides no campo. Entretanto produtos do metabolismo secundário desses fungos podem afetar a eclosão de juvenis ou a ontogenia desses nematóides reduzindo a população de *Meloidogyne* mesmo com o inóculo no interior do cadáver da fêmea (Jatala, 1989).

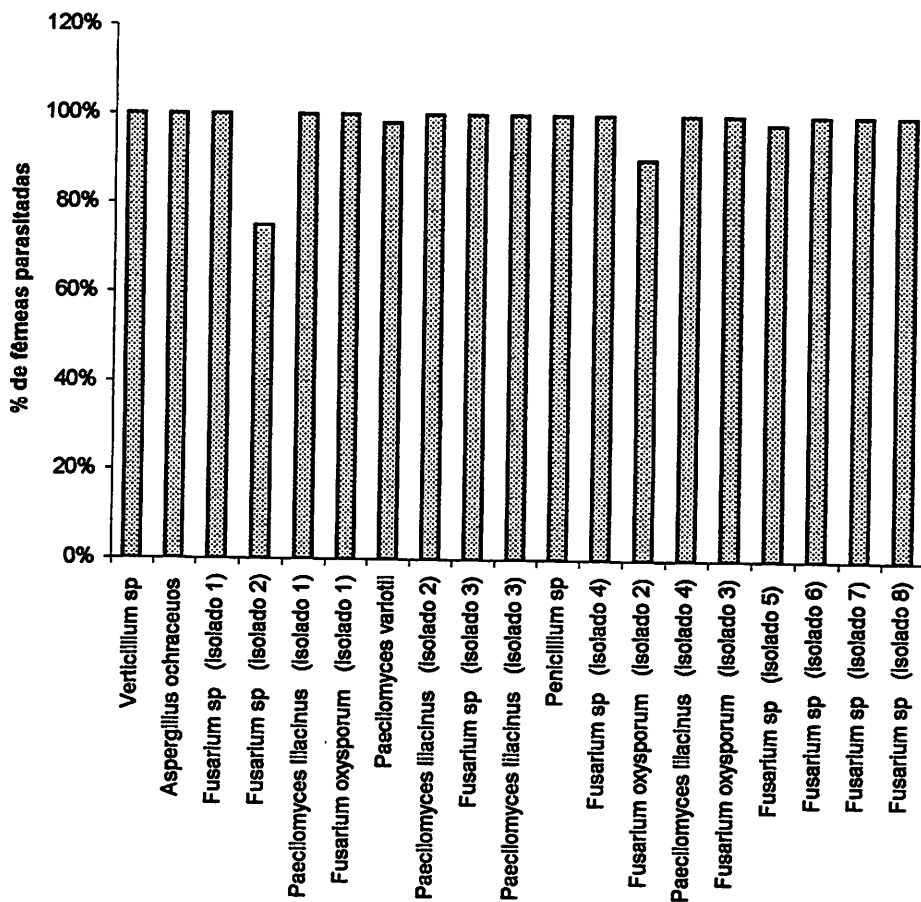


FIGURA 1. Parasitismo em fêmeas de *Meloidogyne javanica* de fungos endógenos ou exógenos a fêmeas de *Meloidogyne* spp.

4 CONCLUSÕES

1. Foram isolados externamente em fêmeas de *Meloidogyne* spp., as seguintes espécies fúngicas: *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. solani*, *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. e *Verticillium* sp. Internamente foram isoladas as espécies: *Paecilomyces variotii*, *P. lilacinus*, *Fusarium* sp, *Verticillium* sp. e *Aspergillus ochraceus*.

2. O gênero *Fusarium* foi o mais freqüentemente encontrado no corpo de fêmeas de *Meloidogyne* spp. entre o isolados fúngicos, sendo as espécies *F. solani* e *F. oxysporum* as mais comuns.

3. Todos os isolados demonstraram alta capacidade de parasitismo de fêmeas de *Meloidogyne javanica*, “in vitro”.

5 LITERATURA CITADA

- CHEN, S.; DICKSON, D.W.; KIMBROUGH, J.W.; MCSORLEY, R.; MITCHELL, D.J. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a florida soybean field. *Journal of Nematology*, Iowa, v.26, n.3, p.296 - 303, Feb.1994.
- COSTA, S.B.; CAMPOS, V.P. Obtenção de fêmeas de *Herodera glycines* em hidroponia e testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos a fêmeas de *H. glycines* e de *Meloidogyne* spp. *Summa Phytopatologica*, Jaboticabal, v.23, n.314, p. 239-242, 1997.
- FREIRE, F.C.O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.10, p. 577-596, 1985.
- GODOY, G.R.; RODRIGUEZ-KÁBANA.; MORGAN-JONES. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in alabama soil: a mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica*, Florida, v.13, n.2, p. 201-213, 1983.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BONCAGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes. *International Potato Center*, Lima, v.3, p. 3, 1979.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, Lima, v.24, p.453-489, 1989.
- KERRY, B. R.; CRUMP, D.H. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica*, Leiden, v.23, p.193-201, 1977.
- KERRY, B.R.; MULLEN, L.A. Fungal parasites of some plant parasitic nematodes. *Nematropica*, Alabama, v.11, n.1, p. 187-189, 1981.

- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES- KABANA, R. Species of *Verticillium* and *Paecilomyces* as parasites of cysts and root-knot nematodes. *Phytopathology*, Saint. Paul, v.70, n.9, p.884-889, Sept. 1980.
- MORGAN- JONES, G.; RODRIGUES - KABANA, R. Species of *Verticillium* and *Paecilomyces* as parasites of cysts and root-knot nematodes. *Phytopathology*, Davia, v.74, n.5, p. 831, May 1984.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES- KABANA, R. Phytonematode pathology: fungal modes of action. a perspective. *Nematropica*, Alabama, v.15, n.1, p.107-114, 1985.
- NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de minas gerais e estudos da capacidade predatória e do crescimento "in vitro" de alguns de seus isolados. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.15, n.2, p.152-162, 1991.
- ODUOR-OWINO, P.; WAUDO, W. Effects of five fungal isolates on hatching and parasitism of root-knot nematode eggs, juveniles and females. *Nematologia Mediterranea*. Nairobi, Kenya, v..24, p. 189-194, 1996.
- NELSON, P.E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, E.M.; BELL, A.A.; BECKMAN, C.H. *Fungal wilt disease of plants*. New york, p. 51-80, 1981.
- RIBEIRO, R.C.F.; CAMPOS, V.P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento "in vitro" de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. no sul de minas gerais. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.17, n.2, p.132-139, 1993.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES.; GINTIS, B.O. Effects of chitin amendmets to soil on *Heterodera glycines*, microbial population, and colonization of cysts by fungi. *Nematropica*, Alabama, v.14, n.14, p.10-25, 1984.
- SANTOS, M.A.DOS. FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Detection and ecology of nematophagous fungi frombrazilian soils. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.15, n.2, p.121-134, 1991.

SILVA, J.F.V.; CAMPOS, V.P. Fungos endoparasitas de nematóides que ocorrem no Sul de Minas Gerais, Brasil. 2. Resultados de tratamentos e avaliação "in vitro" da capacidade predatória de *Haptaglossa heterospora*. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v.15, n.2, p.104-110, 1991.