

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS SOBRE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, *M. JAVANICA* E *PRATYLENCHUS ZEA*

G.C.S. Alves¹, J.M. dos Santos², P.L.M. Soares², F.G. de Jesus³, E.J. de Almeida^{2*}, R.T. Thuler⁴

¹Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, CP 131, CEP 74690-900, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: gleinacosta@yahoo.com.br

RESUMO

Considerando as perdas causadas por nematoides às diversas culturas, as rizobactérias se apresentam como uma alternativa para manejar esse patógenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação de 20 isolados de rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e sobre a motilidade de *Pratylenchus zae*. O experimento foi instalado em condições de laboratório e em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, constituídas por uma câmara de eclosão cada. As avaliações foram realizadas a cada 72 horas. Após as avaliações observou-se que nenhum dos isolados avaliados influenciaram a eclosão de *M. incognita*, entretanto para *M. javanica*, os isolados FCAV 8 e FCAV 10 proporcionaram pronunciada ação ovicida. Entre os isolados testados sobre a motilidade dos nematoides-das-galha apenas os isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* evidenciaram potencial como agente do controle de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. Quando se avaliou a motilidade dos isolados sobre espécimes ativos de *P. zae*, observou-se que os isolados FCAV 5, FCAV 7 e *B. amyloliquefaciens* exibiram potencial como agentes do controle biológico de *P. zae*. Estes resultados confirmam que entre as rizobactérias podem ser encontrados agentes eficazes para o controle de nematoides.

PALAVRAS-CHAVE: Nematóide-das-galhas, nematóide-das-lesões-radiculares, motilidade, controle biológico.

ABSTRACT

IN VITRO ASSESSMENT OF THE EFFECT OF RHIZOBACTERIA ON *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, *M. JAVANICA* AND *PRATYLENCHUS ZEA*. Considering the losses caused by nematodes to different host plant, rhizobacteria are presented as an alternative to control such pathogens. So the goal of this study was to evaluate *in vitro* the action of 20 isolates of rhizobacteria on hatching and motility of second stage juveniles of the *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* and on the motility of *Pratylenchus zae*. The experiment was conducted under laboratory conditions and in a completely randomized design with four replications, and each experimental plot was represented by a hatching chamber. Measurements were spaced every 72 hours. After the evaluations showed that the isolates not influenced the emergence of *M. incognita*, *M. javanica* entertaining for isolates FCAV 8 and 10 showed pronounced ovicidal action. Among the isolates tested on the motility root-knot nematode, only isolates of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* showed potential as an agent for control of second stage juveniles of *M. javanica*. When we assessed the motility of isolated active on specimens of *P. zae* isolates the FCAV 5, 7 and FCAV *B. amyloliquefaciens* exhibited potential as agents of biological control of *P. zae*. These results confirm that among the rhizobacteria may be found effective agents for the control of nematodes.

KEY WORDS: Root-knot nematode, root-lesion nematode, motility, biological control.

INTRODUÇÃO

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) ou 'Plant Grown Promter Rizobac-

teria' (PGPR) são bactérias de solo que colonizam as raízes. São epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que promovem o crescimento e a bioproteção de plantas (MARIANO *et al.*, 2004) e podem representar

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil.

³Instituto Federal Goiano, Urutaí, GO, Brasil.

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil.

*Pós-Doutorando Fapesp.

10% da população de micro-organismos na região da rizosfera (ROBBS, 1991). A promoção de crescimento das plantas pode ser direta, por meio do aumento da taxa de germinação, crescimento de raízes, tubérculos, caules e colmos, além dos aumentos na floração e no rendimento (LUZ, 1996). Esses efeitos são resultantes da produção de fitormônios, ácido cianídrico, enzimas, como a ACC-deaminase. Além disso, outros processos resultantes da ação de rizobactérias podem estimular o crescimento das culturas, tais como, fixação do nitrogênio da atmosfera, mineralização de nutrientes, solubilização de fósforo, oxidação de enxofre, aumento da permeabilidade das raízes, estímulo à absorção de nutrientes e a produção sideróforos. (ENEBAK *et al.*, 1998). A ação benéfica das rizobactérias, também, pode ser indireta por meio do controle de micro-organismos patogênicos (LUZ, 1996). Quando a planta é infectada por um patógeno, as rizobactérias podem atuar como agentes de controle biológico, por meio da produção de metabólitos bacterianos tais como, antibióticos e enzimas que degradam a parede celular do patógeno afetando-o diretamente (ENEBAK *et al.*, 1998). Os produtos do metabolismo dessas bactérias podem agir diretamente sobre a motilidade e/ou sobrevivência de embriões no interior dos ovos e diferentes estádios de desenvolvimentos dos nematoides (CAMPOS *et al.*, 1998).

Algumas PGPR's são produtoras de enzimas líticas, como quitinases e proteases que degradam as paredes de ovos de espécies de *Meloidogyne*, enquanto outras atrasam a eclosão de juvenis de segundo estágio (J₂), causam a mortalidade de formas infectantes dos nematoides ou interferem no processo de reconhecimento da planta hospedeira (SPIEGEL *et al.*, 1990).

Ensaio *in vitro* têm demonstrado os efeitos de metabólitos sobre a eclosão e motilidade de juvenis (CAMPOS *et al.*, 1998). Cerca de 1% de mais de 5.000 isolados de rizobactérias obtidos de diferentes plantas apresentaram habilidade de produzirem compostos e causarem a inibição completa ou parcial do movimento dos J₂ de *M. incognita*, e 20% desses também reduziram o número de galhas em raízes de pepino, em casa de vegetação (BECKER *et al.*, 1998).

Considerando a diversidade de vida no solo e suas estreitas associações entre os diferentes grupos de micro-organismos, podendo ter interações sinérgicas de predação ou parasitismo que promovem a bioproteção e crescimento das plantas, não se deve ignorar o potencial do controle biológico das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no controle de nematoides como opção eficaz para o manejo desses fitopatógenos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação de 20 isolados de rizobactérias sobre a eclosão e motilidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* (Kofoid

& White) Chitwood e *M. javanica* (Treb) Chitwood e sobre a motilidade de formas ativas de *Pratylenchus zeae* Graham. Buscando informações sobre possíveis agentes de controle biológico para nematoides de relevância entre várias culturas de importância econômica para o país.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das subpopulações dos nematoides

As subpopulações de *M. incognita* e de *M. javanica* foram recuperadas de raízes infectadas de algodoeiro, da região de Barreiras (BA) e de quiabeiro da região de Piacatu (SP), respectivamente. As espécies foram previamente identificadas com base nos caracteres morfológicos do padrão perineal, preparado conforme TAYLOR; NETSCHER (1974), e na morfologia da região labial dos machos, conforme EISENBACK *et al.* (1981). Essas subpopulações foram mantidas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicon*) 'Santa Cruz Kada', em vasos de cerâmica com capacidade para seis litros, contendo uma mistura de terra e areia na proporção 1:2, previamente autoclavada, em casa de vegetação. A subpopulação de *P. zeae* foi recuperada de raízes de plantas de cana-de-açúcar da região de Pontalinda, SP, identificada com base nos caracteres morfológicos de fêmeas adultas, segundo GONZAGA (2006).

A partir das raízes de tomateiro exibindo galhas, cerca de 60 dias após a inoculação, foi preparada uma suspensão contendo ovos e J₂ para cada uma das espécies dos nematoides de galha (HUSSEY; BARKER, 1973). A concentração de ovos e de juvenis de segundo estágio nessas suspensões foi estimada com auxílio de uma câmara de contagem de Peters, em um microscópio fotônico (SOUTHEY, 1970) e ajustado para 4.000 ovos e J₂/mL. Com o restante das suspensões, foram montadas câmaras de eclosão, segundo a metodologia descrita por CLIFF; HIRSCHMANN, (1985), sendo que cada câmara continha 20 mL da suspensão de ovos. Para a obtenção de suspensões de J₂ estas câmaras foram incubadas por cinco dias.

Após a obtenção das suspensões de J₂ estas foram colocadas em um funil de Baermann (SOUTHEY, 1970), para obtenção apenas dos J₂ móveis. As coletas dos juvenis eram realizadas a cada 24 horas, sendo necessárias três coletas para obtenção da quantidade de J₂ desejada. As suspensões coletadas do funil eram mantidas em geladeira a 5° C, até a próxima coleta. A concentração da nova suspensão de J₂ foi ajustada para 1.500 J₂/mL. A partir de raízes de plantas de cana-de-açúcar coletadas a campo foi obtida a suspensão de *P. zeae* pela técnica de COOLEN; D'HERDE (1972). A concentração da suspensão de formas ativas foi estimada e ajustada para 300 formas ativas / mL, conforme anteriormente descrito.

Preparo das suspensões bacterianas

Nessa fase o experimento foi dividido em dois ensaios distintos. Com dois grupos diferentes isolados de rizobactérias. O primeiro grupo bacteriano foram codificados como, FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3, FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10, foram provenientes da coleção de rizobactérias do laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (FCAV - UNESP), Câmpus de Jaboticabal, SP. O segundo grupo de rizobactérias foram oriundos do laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), compreendendo os seguintes isolados: *Alcaligenes piechaudii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis kenya*, *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis kurstakii*, *Enterobacter cloacae* e *Kluyvera ascorbata*.

As rizobactérias foram multiplicadas em placas de Petri de plástico de 90 mm de diâmetro, esterilizadas com raios gama, contendo meio de cultura TSA "Trypic Soy Agar" e incubadas por 20 horas a 28° C, em câmara de crescimento do tipo B.O.D. Em seguida, as placas eram levadas à câmara de fluxo laminar, onde as culturas bacterianas foram ressuscitadas em água esterilizada, com o auxílio de uma alça de Drigalsk. Cada suspensão bacteriana foi adicionada, separadamente, a um erlenmeyer de vidro contendo 160 mL de água autoclavada. E, com o auxílio de um espectrofotômetro foi preparada uma nova suspensão aquosa ajustada para densidade ótica $OD_{625} = 0,2$, para os isolados provenientes da FCAV/UNESP.

Para os isolados bacterianos provenientes da UFRPE, a suspensão aquosa foi ajustada para uma densidade ótica $OD_{625} = 0,7$, devido resultados promissores obtidos com estudos preliminares realizados para insetos.

Efeito de isolados de rizobactérias sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* e de *M. javanica*

Após determinada a densidade ótica das suspensões bacterianas, 20 mL da suspensão de cada isolado foi adicionada, separadamente, às câmaras de eclosão, para avaliação da influência destes isolados bacterianos sobre a eclosão dos juvenis de *M. incognita* e de *M. javanica*. A eclosão desses nematoides em água foi utilizada como controle.

A seguir, 1 mL da suspensão contendo 4.000 ovos dos nematoides foi adicionado, individualmente, a cada uma das câmaras de eclosão. As câmaras contendo as suspensões de rizobactérias e água, ovos de *M. incognita* e de *M. javanica* foram mantidas por

nove dias no escuro, em B.O.D a $28 \pm 1^\circ$ C, para os isolados FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3, FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10. Para os isolados de *Alcaligenes piechaudii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis kenya*, *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis kurstakii*, *Enterobacter cloacae* e *Kluyvera ascorbata* o tempo de incubação na B.O.D foi de seis dias. Esse período de avaliação menor que o período de avaliação do grupo das rizobactérias provenientes da FCAV/UNESP foi devido a uma desintegração do papel filtro, utilizado na confecção da câmara de eclosão, após o sexto dia, assim, uma avaliação a mais, aos 9 dias, poderia ter os resultados comprometidos.

Em intervalos regulares de 72 horas, as suspensões de J_2 das câmaras de eclosão foram recuperadas, com o auxílio de pipeta de Pasteur e transferidas para béqueres de 100 mL. Em seguida igual volume da suspensão bacteriana ou de água foi repostado em cada câmara. Posteriormente estimou-se a população de J_2 em cada suspensão ao microscópio fotônico, com auxílio da câmara de contagem de Peters (SOUTHEY, 1970). Determinaram-se os percentuais de eclosão de J_2 e, para efeito de comparação entre os tratamentos, a taxa de eclosão em água (testemunha) foi considerada como 100%, comparando os demais tratamentos com a testemunha. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada uma delas constituída por uma câmara de eclosão. Como os dados não atendiam a distribuição normal estes foram transformados para raiz ($x + 0,5$), submetidos à análise de variância pelo Teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a $p > 0,05$ de probabilidade.

Efeito de isolados de rizobactérias sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*, de *M. javanica* e de *Pratylenchus zeae*.

Os mesmos isolados bacterianos foram empregados para o estudo da ação dessas rizobactérias sobre a motilidade de J_2 de *M. incognita* e de *M. javanica* e sobre formas ativas de *P. zeae*. Foi determinada a densidade ótica de cada uma das suspensões bacterianas aquosas como descrito anteriormente. A seguir, 20 mL da suspensão de cada isolado foram adicionados, separadamente, a cada uma das câmaras de eclosão (CLIFF; HIRSCHMANN, 1985), a água foi utilizada como controle. Às câmaras foram adicionado, separadamente, 1 mL de suspensão de J_2 de *M. incognita* e de *M. javanica*, contendo 1.500 espécimes / mL e 1 mL de suspensão de *P. zeae*, contendo 300 espécimes/mL, obtidos como anteriormente descrito. A seguir, essas câmaras foram mantidas por nove dias no escuro, em B.O.D a $28 \pm 1^\circ$ C para os isolados FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3,

FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10 Para os demais isolados seguiu-se a mesma metodologia, variando apenas a leitura da densidade óptica $OD_{625} = 0,7$ e o tempo de imersão, que foi de seis dias.

O delineamento experimental e as avaliações seguiram a mesma metodologia do item anterior. Entretanto, para se estimar o número de indivíduos móveis ou imóveis 1 mL de solução 1 N de NaOH foi adicionado a 10 mL da suspensão de nematoides e, imediatamente utilizando-se a câmara de contagem de Peters foi estimado ao microscópio fotônico a população de formas móveis e imóveis, conforme CHEN; DICKSON (2000).

Os dados não atendiam a distribuição normal estes foram transformados para raiz ($x + 0,5$), submetidos à análise de variância pelo Teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a $p > 0,05$ de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de isolados de rizobactérias sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* e de *M. javanica*

Os dados referentes à imersão dos ovos de *M. incognita* e *M. javanica*, em suspensões dos isolados bacterianos FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3, FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10 por nove dias (Fig. 1A) evidenciaram que para *M.*

incognita os isolados não diferiram estatisticamente entre si, nem em relação a testemunha (água). Entretanto para *M. javanica*, observou-se maior ação ovicida dos isolados FCAV 2, FCAV 6, FCAV 8 e FCAV 10, diferiram dos demais isolados, da testemunha e não diferiram estatisticamente entre si. Para melhor apresentação dos resultados, porcentagens foram calculadas, com as médias originais apresentadas na Figura 1. Para esse cálculo a testemunha foi considerada como 100%. Os isolados FCAV 2, FCAV 6, FCAV 8 e FCAV 10, Proporcionaram uma redução na porcentagem de eclosão de 53,5% para o isolado FCAV 2, 40,50% para o isolado FCAV 6, 75,3% para o isolado FCAV 8 e 64,5% para p isolado FCAV 10, quando comparados a testemunha.

Na imersão dos ovos de *M. incognita* e *M. javanica* em isolados bacterianos de *Alcaligenes piechaudii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis kenyae*, *B. thuringiensis kurstakii*, *Enterobacter cloacae* e *Kluyvera ascorbata*. por 6 dias, não houve diferença estatística significativa quanto à eclosão de juvenis de *M. incognita* e *M. javanica* entre os isolados e a testemunha em nenhuma avaliação (Fig. 1B).

Como no presente trabalho, OOSTENDORP; SIKORA (1990) também observaram completa inibição da eclosão de *Heterodera schachtii* por filtrados de culturas bacterianas. Por outro lado, o contato direto da calda contendo *B. subtilis* com juvenis de *H. glycines*, recém-eclodidos, não ocasionou redução significativa da população de nematoide após sete dias de incubação.

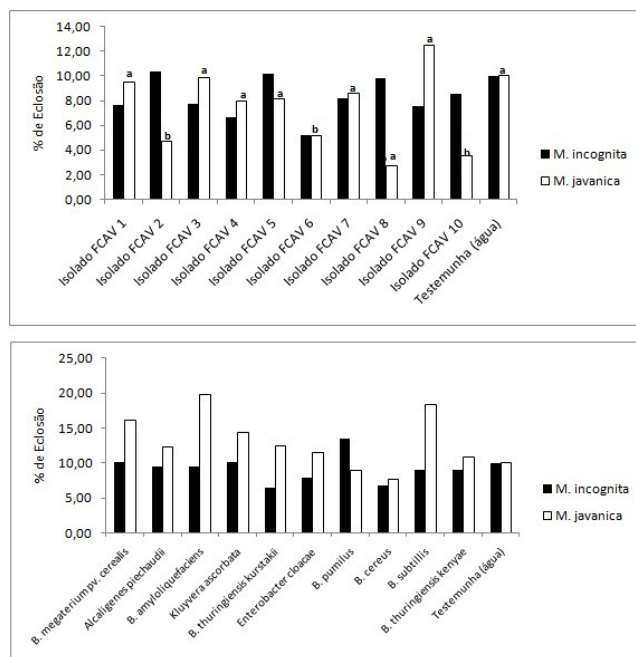


Fig. 1 - Médias da eclosão de J2 de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* imersos em suspensões de diferentes isolados de rizobactérias *in vitro*. A) Ovos imersos por nove dias (densidade ótica $OD_{625} = 0,2$). *M. incognita* F: 0,31 CV: 61,29% e *M. javanica* F: 5,27 CV: 30,87%. B) Ovos imersos por seis dias (densidade ótica $OD_{625} = 0,7$). *M. incognita* F: 1,73 CV: 21,91% e *M. javanica* F: 1,65 CV: 32,57%. Dados transformados em raiz de ($x + 0,5$). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott a 5%.

Contrariando estes resultados, HUANG *et al.* (2010) observou que as substâncias químicas produzidas por *B. megaterium*, tem potencial ação nematicida contra *M. incognita*, chegando a inibir 100% da eclosão dos juvenis.

ARAÚJO *et al.* (2002) trabalhando com *B. subtilis*, conseguiu reduzir significativamente a eclosão de juvenis de *H. glycines in vitro*, quando comparou os exsudados tratados e não tratados com a bactéria. Os mesmos autores concluíram que o mecanismo envolvido no estímulo à eclosão deve estar relacionado a metabólitos produzidos no desenvolvimento da bactéria, pois a utilização de células separadamente não proporcionou a mesma redução encontrada quando foi utilizado a calda com a bactéria.

Efeito de isolados de rizobactérias sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e de *Pratylenchus zeae*

Na avaliação da atividade dos juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e *M. javanica* imersos por nove dias nos isolados bacterianos FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3, FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10 (Fig. 2 - A) não houve diferença estatística entre os isolados quanto à percentagem de juvenis imóveis, ou supostamente mortos, para nenhum dos nematoides de galhas avaliados.

Na imersão de J2 de *M. incognita* por seis dias em suspensões dos isolados bacterianos *Alca-*

ligenes piechaudii, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. thuringiensis kenyae*, *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis kurstakii*, *Enterobacter cloacae* e *Kluyvera ascorbata*. (Fig. 2B) observou-se que os isolados de *B. cereus* e *B. thuringiensis kenyae* proporcionaram as menores percentagens em relação aos juvenis imóveis de *M. incognita*. O isolado de *B. cereus* diferiu da testemunha. Nesse caso também se calculou a porcentagem do controle, usando as médias, a testemunha foi considerada como 100% (Fig. 2), Os isolados que apresentaram maior efeito nocivo aos juvenis foram os isolados de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, aumentando a motilidade desses nematoides em 310,34% e 282,18% respectivamente, quando comparados a testemunha. Esses resultados evidenciam o potencial do isolado de *B. amyloliquefaciens* como agente no controle biológico de *M. incognita*.

Esses isolados bacterianos não proporcionaram diferenças estatísticas para *M. javanica* (Fig. 2B). Fica evidente, na pesquisa, a especificidade das bactérias em relação aos nematoides, uma vez que os que se apresentam mais eficientes para o controle de *M. javanica* não foram os mesmos para *M. incognita*.

FREITAS (2008) também obtiveram redução de 53% no número de galhas formadas por *M. incognita* em raízes de tomateiro, utilizando uma mistura de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, três *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e um *Bacillus* spp.

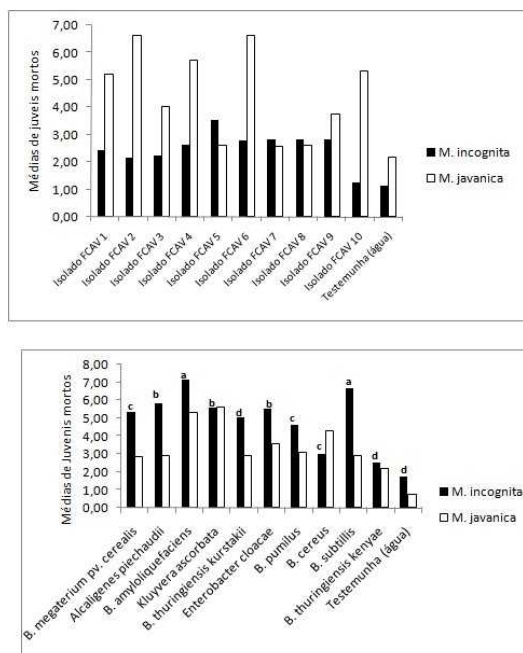


Fig. 2 - Médias de J2 de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* imóveis, ou supostamente mortos imersos em suspensões de diferentes isolados de rizobactérias *in vitro*. A) J2 imersos por nove dias (densidade ótica OD₆₂₅=0,2). *M. incognita* F: 0,26 CV: 99,99% e *M. javanica* F: 2,11 CV: 47,00%. B) J2 imersos por seis dias (densidade ótica OD₆₂₅ = 0,7). *M. incognita* F: 139,37 CV: 4,25% e *M. javanica* F: 0,80 CV: 66,74%. Dados transformados em raiz de (x + 0,5). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott a 5%.

SIDDIQUI *et al.* (2001) também verificaram por meio de testes *in vitro* um efeito nematicida de diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *B. subtilis* sobre juvenis de segundo estágio de *M. javanica* e zonas de inibição do crescimento de *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os autores observaram, ainda, em casa de vegetação e campo, diferentes níveis de supressão da infecção causada por tais fungos e pelos nematoides em *Vigna radiata*.

SOUSA *et al.* (2006), realizando bioensaios *in vitro* com isolados da bactéria filamentosa *Streptomyces* sp. (AC-26), *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) *Streptomyces* N0035 (AC-95), observaram um aumento da mortalidade dos J2, quando comparados com a testemunha. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (AC-92) proporcionou 98,2% de mortalidade dos J2, quando comparado aos 27,3% observados na testemunha, destacando-se como o isolado mais eficiente no controle de *M. incognita in vitro*.

Para melhor entendimento dos resultados, estes também foram calculados e apresentados em porcentagens com base nas médias originais. A testemunha foi considerada 100%, na avaliação de isolados bacterianos em suspensão sobre espécimes de *P. zae* imersos por nove dias aos diferentes isolados (FCAV 1, FCAV 2, FCAV 3, FCAV 4, FCAV 5, FCAV 6, FCAV 7, FCAV 8, FCAV 9 e FCAV 10).

Observou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos FCAV 5 e FCAV 7, sendo que estes não diferiram entre si, mas diferiram de todos os demais tratamentos (Fig. 3A). Estes isolados

foram os que menos permitiram a passagem dos nematoides pela câmara de eclosão, representando uma mortalidade de 532% em relação à testemunha. Quando se avaliou os isolados de *B. megaterium* pv. *cerealis*, *A. piechaudii*, *B. amyloliquefaciens*, *K. ascorbata*, *B. thuringiensis kurstakii*, *E. cloacae*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis kenyae*, sobre espécimes de *P. zae*, evidenciou-se ação nematicida dos tratamentos *B. megaterium* pv. *cerealis*, *A. piechaudii*, *B. amyloliquefaciens*, *K. ascorbata*, *B. thuringiensis kurstakii* (Fig. 3B). Estes isolados foram os que menos permitiram a passagem do nematoide pela câmara de eclosão

Nos tratamentos referentes aos isolados FCAV 5 e FCAV 7 e *B. amyloliquefaciens* não foram recuperados espécimes de *P. zae* durante o período de avaliação do experimento, o que indica que os isolados inativaram os nematoides ainda sobre o papel na câmara de eclosão, impedindo sua movimentação. Por conseguinte, estes têm pronunciada ação nematicida sobre *P. zae* mostrando-se agentes promissores do controle biológico dessa espécie de nematoide estudada.

DICKLOW *et al.*, (1993) estudando o efeito de *Streptomyces costaricanus* sobre *M. incognita*, *Pratylenchus penetrans* e *Rotylenchus reniformis*, observaram que a bactéria reduziu o número de galhas em raízes de pimenteira plantada em solo naturalmente infestado, bem como a população de *P. penetrans* em raízes de morango e a população de *R. reniformis* em tomateiro e pimenteira.

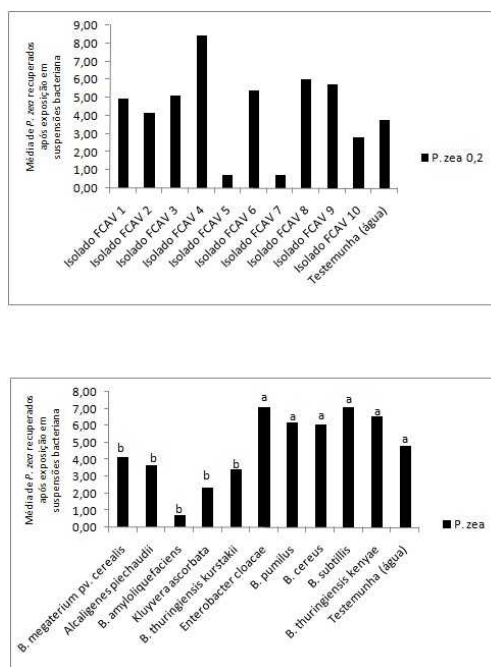


Fig. 3 - Médias de *Pratylenchus zae* imóveis recuperados após imersão em suspensões de diferentes isolados de rizobactérias *in vitro*. A) *P. zae* imersos por nove dias (densidade ótica OD₆₂₅ = 0,2), F: 4,47 CV: 75,20%. B) *P. zae* imersos por seis dias (densidade ótica OD₆₂₅ = 0,7), F: 4,22 CV: 30,34%. Dados transformados em raiz de (x + 0,5). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-knott a 5%.

Várias espécies de bactérias foram encontradas em solos na região da rizosfera de batatas e evidenciaram atividade antagonista aos nematoides das lesões radiculares (*P. penetrans*) (TIAN *et al.*, 2007).

Os resultados apresentados no presente trabalho e na literatura corroboram com o mecanismo de ação publicado por FREITAS (2008) de que as rizobactérias interferem na formação do embrião, na eclosão, na mobilidade do nematoide e conseqüentemente interfere no reconhecimento do hospedeiro, o que interfere diretamente na alimentação e na reprodução dos fitonematoides.

CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa os isolados bacterianos FCAV 6 e FCAV 8 proporcionaram ação ovicida para *M. javanica*. Entretanto, não tiveram a mesma ação contra ovos de *M. incognita*. Entre os isolados testados sobre a motilidade dos nematoides de galhas, apenas os isolados de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* evidenciaram potencial como agente do controle de J_2 de *M. javanica*. Os isolados FCAV 5, FCAV 7 e *B. amyloliquefaciens* mostraram-se eficientes no controle de *P. zeae*. Estes resultados confirmam que entre as rizobactérias podem ser encontrados agentes eficazes para o controle de nematoides.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.F.; VELOSO-SILVA, J.F.; ARAÚJO, A.S.F. Influência de *B. subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural*, v.32, p.197-202, 2002.

BECKER, J.O.; ZAVALETA-MEJIA, E.; COLBERT, S.F.; ACHROTH M.N.; WEINHOLD A.R. HANCOCK, J.G & VAN GUNDY S.D. Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, v.78, p.1466-1469, 1998.

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

CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, v.32, p.117-121, 2000.

CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H.H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, v.17, p. 445-449, 1985.

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

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

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER J.N.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. *A guide to the four most common species of root-knot nematodes (Meloidogyne Species) with a pictorial key*. Raleigh: North Carolina State University and United States Agency for International Development, 1981. 48p.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Science*, v.44, p.139-144, 1998.

FREITAS, L.G. *Rizobactérias versus Nematóides*. Viçosa: UFV, 2008. 10p. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2009.

GONZAGA, V. *Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de Pratylenchus Filijev, 1936 que ocorrem no Brasil*. 2006. 78f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 2006.

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

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

LUZ W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.4, p.1-49. 1996.

MARIANO R.L.R.; SILVEIRA E.B.; ASSIS S.M.P.; GOMES A.M.A.; NASCIMENTO A.R.P.; DONATO V.M.T. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v.1, p.89-111, 2004.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. In vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Revue de Nématologie*, v.13, p.269-274, 1990.

ROBBS, C. Bactérias como potencial de controle biológico de Fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p.121-133.

SIDDIQUI, Z.A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Applied Soil Ecology*, v.16, n.2, p.179-185, 2001.

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; ALMEIDA, G.M.C.O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1759-1766. 2006.

SPIEGEL, Y.; COHN, E.; GALPER, S.; LAPID, D.; SHARON, E.; CHET, I. Evaluation of chitinolytic microorganisms for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne javani* In: INTERNATIONAL NEMATODOLOGY CONGRESS, 2., 1990, Veldhoven, Canadá. *Abstracts*. Veldhoven, 1990. p.141.

TAYLOR, A.L.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perinéal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica*, v.20, p. 268-269, 1974.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *Microbiology Ecology*, v.61, p.197-213, 2007.

Recebido em 19/5/11

Aceito em 31/10/11