

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DAS GALHAS  
(*Meloidogyne* spp.) EM TOMATEIRO POR RIZOBACTÉRIAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2006

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO NEMATÓIDE DAS GALHAS  
(*Meloidogyne* spp.) EM TOMATEIRO POR RIZOBACTÉRIAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de março 2006

---

Prof. Silamar Ferraz  
(Conselheiro)

---

Prof. Acelino Couto Alfenas

---

Prof. Maurício Dutra Costa

---

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela formação profissional e oportunidade de realização do curso.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao professor Leandro G. Freitas, pela atenção, apoio e orientação e pela amizade.

Aos conselheiros, Reginaldo da Silva Romeiro e Silamar Ferraz pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos professores da universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas, amigos e estagiários do laboratório de Nematologia/BIOAGRO Everaldo, Deisy, Guilherme, Marcelo, Márcio, Ronaldo, Rosângela, Silvia, Vanessa e Wânia pelas sessões de humor, pelo convívio, apoio, ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas do departamento de Fitopatologia.

Aos funcionários do departamento de Fitopatologia pela colaboração e boa vontade.

## **BIOGRAFIA**

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY, filha de Lourival Pereira da Silva e Maria Gonçalves da Silva, nasceu em Araçuaí, MG, em 30 de junho de 1979.

Em janeiro de 2000, concluiu o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em 2002, concluiu o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Controle Biológico de Fitonematóides.

Nesse mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em março de 2006.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
CAPÍTULO I.....	9
RESISTÊNCIA INDUZIDA POR <i>Rhizobium etli</i> A <i>Meloidogyne javanica</i> EM TOMATEIRO .....	9
INTRODUÇÃO .....	10
MATERIAL E MÉTODOS .....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
CAPÍTULO II.....	19
OTIMIZAÇÃO DO BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> E <i>Meloidogyne javanica</i> POR <i>Rhizobium etli</i> COM A UTILIZAÇÃO DE HÚMUS .....	19
INTRODUÇÃO .....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26

	Página
CAPÍTULO III .....	33
EFICIÊNCIA DE <i>Rhizobium etli</i> COMO AGENTE DE BIOCONTROLE EM DIFERENTES NÍVEIS POPULACIONAIS DE <i>Meloidogyne javanica</i> E <i>Meloidogyne incognita</i> * .....	33
INTRODUÇÃO .....	35
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
CAPÍTULO IV .....	47
RESISTÊNCIA INDUZIDA EM TOMATEIRO A <i>Meloidogyne incognita</i> E <i>Meloidogyne javanica</i> POR RIZOBACTÉRIAS* .....	47
INTRODUÇÃO .....	49
MATERIAL E MÉTODOS .....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
CONCLUSÕES GERAIS .....	63

## RESUMO

FABRY, Cléia de Fátima Silva, D.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.  
**Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Conselheiros: Silamar Ferraz e Reginaldo da Silva Romeiro.

O nematóide das galhas, *Meloidogyne* spp., é responsável por grandes perdas nas produções agrícolas. Bactérias não patogênicas habitantes da rizosfera ou do rizoplano, conhecidas como rizobactérias, têm apresentado um grande potencial para o controle de fitonematóides. Assim, os objetivos gerais desse trabalho foram: avaliar a indução de resistência causada por *Rhizobium etli* a *Meloidogyne javanica* em tomateiro; verificar o potencial de biocontrole por *R. etli* contra *M. javanica* e *M. incognita* em diferentes densidades de inóculo dos patógenos em tomateiro; verificar a potencialização da bactéria *R. etli* para o biocontrole de *M. incognita* e *M. javanica* pela adição de húmus ao solo e testar isolados com comprovada eficiência antagonística a outros fitopatógenos para o controle de *M. javanica* e *M. incognita* em tomateiro. A rizobactéria *R. etli* G12 induziu resistência sistêmica a *M. javanica* em tomateiro crescido em sistema de raiz bipartida sendo que o número de galhas e de ovos por sistema radicular foram reduzidos em 35,3% e 38,8%, respectivamente, mas não houve promoção de crescimento das plantas nas condições avaliadas. Nos experimentos onde se investigou a aplicação de húmus de minhoca ao solo nas concentrações de 0, 50 e 150 g/1,5 kg de solo no ensaio com *M. incognita* e de 0, 50, 100, 150 e 200g no ensaio

com *M. javanica*, observou-se o aumento da atividade antagonística de *R. etli* sobre ambos os nematóides, todavia, a utilização de húmus sem a aplicação da rizobactéria não resultou em controle dos nematóides. *Rhizobium etli* G12 na presença de húmus promoveu o crescimento da plantas, provocando aumento do peso da biomassa verde e da altura das plantas. Verificou-se que a bactéria *R. etli* é eficiente em reduzir o número de galhas e de ovos de *M. javanica* e *M. incognita* tanto em baixa como em alta concentração de inóculo dos nematóides (2.000 e 4.000 ovos). Observou-se que os 27 isolados de rizobactérias testados foram eficientes em controlar *M. incognita* e *M. javanica* quando aplicados em microbiolização das sementes, mas não controlaram os nematóides quando aplicados na forma de rega da planta com suspensão de células.



## ABSTRACT

FABRY, Cléia de Fátima Silva, D.S. Universidade Federal de Viçosa, March 2006.  
**Rhizobacteria-mediated induction of resistance in tomato against root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.).** Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Committee Members: Silamar Ferraz and Reginaldo Da Silva Romeiro.

Root-knot nematode, *Meloidogyne* spp., is responsible for great losses in agricultural production. Non-pathogenic bacteria inhabitants of the rhizosphere or rhizoplan, known as rhizobacteria, have shown a great potential for controlling phytonematodes. Thus, the objectives of this work were: to evaluate the induction of resistance in tomato against *Meloidoyne javanica* mediated by *Rhizobium etli*; verify the biocontrol potential of *R. etli* against *M. javanica* and *M. incognita* in different pathogen inoculum densities in tomato; verify the potentialization of *R. etli* through addition of humus to the soil for the biocontrol of *M. javanica* and *M. incognita*; and test isolates with proven antagonistic efficiency against other phytopathogens for the control of *M. javanica* and *M. incognita* in tomato. Rhizobacteria *R. etli* G12 induced systemic resistance against *M. javanica* in tomato grown in split-root system, having the number of galls and eggs per root system reduced in 35.3% and 38.8% respectively, but there was no plant growth promotion in the studied conditions. In the experiments with earthworm humus application to the soil, at concentrations 0, 50 and 150 g/1.5 kg of soil in the assay with *M. incognita*, and 0, 50, 100, 150 and 200g in the assay with *M. javanica*, increase in the antagonistic activity of *R. etli* occurred for both nematodes,

however, the use of humus without the application of rhizobacteria did not result in nematode control. *Rhizobium etli* G12 in presence of humus promoted plant growth, resulting in increase in green biomass weight and plant height. Bacterium *R. etli* was efficient in reducing the number of galls and eggs of *M. javanica* and *M. incognita* in both low and high concentrations of nematode inoculum (2,000 and 4,000 eggs). The 27 isolates of tested rhizobacteria were efficient in controlling *M. javanica* and *M. incognita* when applied in seed microbiolization, but it did not control nematodes when applied as plant irrigation with cell suspension.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., compõem um dos grupos mais importantes de parasitas de plantas pois causam grandes reduções na produção agrícola (Sinclair & Backmann, 1993). O controle de fitonematóides tem sido constante motivo de estudos por pesquisadores. Alternativas viáveis e racionais como o controle biológico (Sikora, 1992; Stirling, 1991), o uso de plantas antagonistas (Ferraz & Valle, 1997) e os métodos culturais (Whitehead, 1997) são bem estudadas e aplicadas com sucesso.

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico destacam-se as rizobactérias. Esses organismos têm a rizosfera e o rizoplano das plantas como sítios preferenciais para a multiplicação e a sobrevivência. A interação entre as bactérias e as raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra (Schippers *et al.*, 1987). Aquelas que desempenham efeitos benéficos, por promover o crescimento das plantas e, ou protegê-las contra fitopatógenos, são nomeadas de PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Kloepper *et al.*, 1990). A maioria das rizobactérias pertence aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, os quais apresentam a capacidade de colonizar raízes de plantas e estimular seu crescimento. Outros gêneros de rizobactérias são *Azobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* e *Burkholderia* (Brown, 1974; Elmerich, 1984; Kloepper *et al.*, 1988; Glick, 1995).

As rizobactérias utilizam vários mecanismos para sobreviver na rizosfera e suprimir o ataque de patógenos às plantas, sendo que mais de um mecanismo pode ser utilizado por uma rizobactéria (Melo, 1998). Além disso, são encontradas em grande

quantidade no solo e podem ser cultivadas em meio de cultura, o que facilita o uso em formulações comerciais (Weller, 1988).

As PGPRs atuam com base nos seguintes mecanismos de ação: produção de ácido hidrocianico (HCN) (Luz, 1996), antibióticos (Michener & Smell, 1949), sideróforos, reguladores de crescimento (Boronin *et al.*, 1993), mineralização de nutrientes (Lifshitz *et al.*, 1987) e indução de resistência sistêmica a doenças de plantas (Pieterse *et al.*, 2005). No caso dos nematóides, os mecanismos envolvidos incluem a produção de metabólitos no local de estabelecimento, degradação de exsudatos radiculares reduzindo o estímulo à eclosão e a interferência no processo de reconhecimento da raiz pelo nematóide, devido à ação das bactérias nas lecitinas. Além dos efeitos diretos, as PGPR são capazes de ativar mecanismos de defesa das plantas através da indução de resistência sistêmica (Oostendorp & Sikora, 1990).

Segundo Romeiro (2001), a indução de resistência a patógenos em plantas é conhecida desde o início do século XX, com a pesquisa clássica de Bernard (1911), que ao trabalhar com bulbos de orquídeas e fungos do solo, ele observou a ausência de infecção nos pedaços de bulbos sadios transferidos para o meio de cultura onde esses fungos estavam sendo cultivados. Entretanto, a infecção ocorria se os bulbos sofressem um prévio tratamento térmico. O pesquisador deduziu que os bulbos não tratados não eram infectados porque seus tecidos respondiam a secreções com propriedades antimicrobianas produzidas pelos fungos. É provável que essa tenha sido a primeira vez que se sugeriu a existência de mecanismos de defesa em plantas que poderiam ser ativados por fatores exógenos.

Duas siglas têm sido usadas frequentemente como sinônimos para designar o fenômeno de indução de resistência a doenças de plantas, embora não sejam (Sticher *et al.*, 1997): ISR (Induced Systemic Resistance) e SAR (Systemic Acquired Resistance).

As rotas metabólicas que levam à resistência sistêmica adquirida (SAR) e à resistência sistêmica induzida (ISR) são distintas. SAR caracteriza-se pelo acúmulo de ácido salicílico (AS) e de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), enquanto que, ISR envolve o acúmulo dos reguladores de crescimento ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (van Loon *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2002). Alguns autores concordam que ISR e SAR são fenômenos distintos quanto à forma que leva à indução de resistência, porém bastante semelhante quanto ao resultado final (Pieterse *et al.*, 1998; van Loon, 1998). A semelhança entre ISR por rizobactérias e SAR induzida por patógenos é que ambos os

tipos de resistências são efetivas contra amplo espectro de patógenos de plantas (van Loon *et al.*, 1998).

Van Loon & van Kammen (1970) foram os pioneiros em estudos das proteínas relacionadas com a patogênese (PRPs) como macromoléculas envolvidas na resistência induzida, utilizando como modelo o patossistema fumo-TMV. Essas macromoléculas acumulam-se nas plantas como resposta à infecção por patógenos e como resposta à resistência induzida. Entre as PRPs, as mais estudadas são as quitinases,  $\beta$ -1,3-glicanase e osmotina (van Loon *et al.*, 1994). Estas enzimas podem ser importantes no controle de fitopatógenos, pois degradam a quitina e a  $\beta$ -1,3-glicano, componentes da parede celular de fungos (Potgieter & Alexander, 1966; Schoroth & Hancock, 1982). A quitina é também um constituinte da camada externa dos ovos dos nematóides (Bird & Bird, 1991).

Além das proteínas PRs, muitas outras enzimas estão envolvidas nas reações de defesa das plantas contra fitopatógenos, incluindo peroxidases (PO), fenil-alanina-amônia-liase (PAL) e polifenol-oxidase (PPO) (Mariano & Kloepper, 2000). Estas enzimas catalisam a formação de lignina e outros fenóis que contribuem para a formação de barreiras de defesa, reforçando as estruturas das células das plantas (Avdiushko *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2004).

Ogena *et al.* (2000) estudaram a indução de resistência sistêmica por fitoalexinas em plantas de pepino. Os autores verificaram que plantas de *Cucumis sativus* tratadas com a rizobactéria *Pseudomonas putida* foram protegidas contra *Pythium aphanidermatum*, causador de podridão em raízes. Análises das folhas revelaram acúmulo de compostos fenólicos tóxicos. Raízes de pepino foram tratadas com *Pseudomonas corrugata* e *P. aureofaciens* contra *P. aphanidermatum*. As PGPR foram capazes de induzir altos níveis das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), polifenol oxidase (PPO) assim como peroxidase (PO) com o desenvolvimento da doença (Chen *et al.*, 2000). A bactéria *Rhizobium etli* G12, anteriormente denominada *Agrobacterium radiobacter* strain G12A, e *Bacillus sphaericus* B43 foram eficientes em induzir resistência em plantas de batata contra *Globodera pallida* e *M. incognita* (Hasky-Günter *et al.*, 1994; Mahdy *et al.*, 2001). Em outros estudos, *R. etli* e *B. sphaericus* suprimiram a penetração de *Globodera pallida* nas raízes em experimentos em casa-de-vegetação e campo (Hackenberg & Sikora, 1994; Racke & Sikora, 1992)

Reitz *et al.* (2000) verificaram que a aplicação do lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *R. etli* G12 reduziu a infecção causada pelo nematóide *Globodera pallida*

em plantas de batatas, mesmo em baixas concentrações, confirmando a indução de resistência sistêmica por LPS.

O uso de rizobactérias pode ser vantajoso e de importância para o controle de fitonematóides, uma vez que são inócuas ao homem, não causam impacto ambiental e oferecem maior segurança para aplicadores e consumidores. No entanto, muitos fatores bióticos e abióticos necessitam ser estudados para melhor entendimento do comportamento desses organismos no solo. Neste trabalho, pressupunha-se que a adição de húmus de minhoca ao solo estimularia o antagonismo de *Rhizobium etli* contra *Meloidogyne* spp; e que *R. etli* possuiria efeito antagonístico a *Meloidogyne* spp. mesmo quando esses nematóides estivessem em altas densidades populacionais no solo; e que rizobactérias com potencial antagonístico a fungos e bactérias fitopatogênicas, também possuiriam efeito antagonístico a *Meloidogyne* spp. Assim, os objetivos gerais desse trabalho foram: avaliar a indução de resistência causada por *R. etli* a *M. javanica* em tomateiro; verificar o potencial de biocontrole por *R. etli* contra *M. javanica* e *M. incognita* em diferentes densidades de inóculo dos patógenos em tomateiro; verificar a potencialização da bactéria *R. etli* para o biocontrole de *M. incognita* e *M. javanica* pela adição de húmus ao solo e testar isolados com comprovada eficiência antagonística a outros fitopatógenos para o controle de *M. javanica* e *M. incognita* em tomateiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVDIUSHKO, S.A.; X.S. YE & J. KUÉ. 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints cucumber plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42:441-451.
- BIRD, A.F. & J. BIRD, The structure of nematodes. 1991. Academic Press Inc. San Diego, California. 2<sup>nd</sup>. Ed. 316p.
- BERNARD, N. 1911. Sur la fonction fungicide des bulbes d'ophrydés. *Annual Science Nature (Bot)*, 14:221-234.
- BORONIN, A.M.; V.V. KOCHETKOV.; A.N. DUBEIKOVSKY; & E.A. MORDUKHOVA. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: VI International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, International Society of Plant Pathology, p. 276 (abstr.).
- BROWN, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology*, 12:181-197.
- CHEN, C.; R.R. BÉLANGER; N. BENHAMOU, & T. PAULITZ, 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56:13-23.
- ELMERICH, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Bio/Technology*, 2: 967-978.
- FERRAZ, S. & L.A.C. VALLE. 1997. Controle de fitonematóides por plantas antagônicas. *Caderno Didático n° 7*. Viçosa: Editora UFV. 72p.
- GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:109-117.

- HACKENBERG, C. & R.A. SIKORA. 1994. Influence of temperature and soil moisture on the biological control of the potato-cyst nematode *Globodera pallida* using the plant-health-promoting rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Phytopathology*, 142:338-344.
- HASKY-GÜNTHER, K.; S. HOFMANN-HERGARTEN & R.A. SIKORA. 1998. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundamental and Applied Nematology*, 21:511-517.
- KLOEPPER, J.W.; R. LIFSHITZ, & M.N. SCHROTH. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci. Animal Plant Science* 60-64.
- KLOEPPER, J.W.; R.M. ZABLOTOWICZ, & R. LIFSHITZ, 1990. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. Pp. 315-326 In: Keister, D.I. and Cregan, P.B. eds. *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht, Academic Publishers.
- LIFSHITZ, R.; H. GUILMETTE & M. KOZLOWSKI, 1988. Tn5-mediated cloning of genetic region from *Pseudomonas putida* involved in the stimulation of plant root elongation. *Applied and Environment Microbiology*, 54:3169-3172.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4:1-47.
- MAHDY, M; J. HALLMANN & R.A. SIKORA. 2001. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66(2b):655-662.
- MARIANO, R.L.R.; J.W. KLOEPPER. 2000. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8:121-137.
- MELO, I.S. 1998. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. Pp. 87-110. In: Melo, I.S. de; Azevedo, J.L. de. *Ecologia Microbiana*.
- MICHENER, H.D. & N. SMELL. 1949. Two antifungal substances from *Bacillus subtilis* cultures. *Archives of Biochemistry*, 22:208-214.
- OGENA, M.; F. DAAYF; P. JACQUES; P. THONART; T. BENHAMOU; T.C. PAULITZ & R.R. BÉLANGER. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, 49:523-530.



- OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. Review Nematology, 14: 269-274.
- PIETERSE, C. M. J.; S. C. M. van WEES, J. A. van PELT; M. KNOESTER; R.; LAAN, N., GERRITS; P. J. WEISBEEK. & L. C. van LOON. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10:1571-1580.
- PIETERSE, C. M. J.; S. C. M. van WEES, J. A. van PELT; R. & L. C. van LOON. 2002. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology, 4:535-544.
- PIETERSE, C.M.J.; J.A. van PELT; S.C.M. van WESS; J. TON; B.W.M. VERHAGEN; K. LEON-KLOOSTERZIEL; S. HASE; M. DE VOS; V.V. OOSTEN; M. POZO; S. SPOEL; S.V.E.A. KOORNNEEF; A. CHALFUN-JUNIOR; M.L.V. RESENDE & L.L van LOON. 2005. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 13:277-295.
- POTGIETER, H. & M. ALEXANDER. 1966. Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. Journal of Bacteriology, 91:1526-1532.
- RACKE, J. & R. A. SIKORA. 1992. Wirkung der pflanzengesundheitsfördernden Rhizobakterien *Agrobacterium radiobacter* und *Bacillus sphaericus* auf den *Globodera pallida* – Befall der Kartoffel und das Pflanzenwachstum. Journal of Phytopathology, 134:198-208.
- REITZ, M.; K. RUDOLPH; I. SCHRÖDER; S. HOFFMANN-HERGARTEN; J. HALLMANN, & R.A. SIKORA. 2000. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. Applied and Environment Microbiology, 66: 3515-3518.
- ROMEIRO, R.S. 2001. Resistência induzida em plantas a patógenos no Brasil - Uma visão da pesquisa. Fitopatologia brasileira (suplemento), 26:254-255.
- SCHIPPERS, A.B.; A.W. BAKKER, & P.H.M.A. BAKKER, 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology, 25:339-358.
- SCHROTH, M.N. & J.C. HANCOCK. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science, 216:1376-1381.
- SIKORA, R.A. 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Med. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, 53(2b): 867-878.

- SIKORA, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30: 245-270.
- SILVA, H.S.A.; R.S. ROMEIRO; D. MAGAGNAN; B.A. HALFELD-VIEIRA M.C.B. PEREIRA & A. MOUNTEER. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase enzyme activities. *Biological Control*, 29:288-295.
- SINCLAIR, J.B. & P.A. BACKMANN. 1993. (Eds.) Compendium of soybean diseases. 3. ed. St. Paul, Minnessota: APS Press, 106p.
- STICHER, L., MAUCH MANI, B. & METRAUX, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- STIRLING, G.R., 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress problems, and prospects. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- van LOON , L.C. & A. KAMMEN. 1970. Polyacrylamide disc eletroforesis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". *Virology*. 40:199-211.
- van LOON, L.C.; W.S. PIERPOINT; T. BOLLER & V. CONEJERO. 1994. Recommendations for naming plant patogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12:245-264.
- van LOON, L. C.; P. A. H. M BAKKER & C. M. J. PIETERSE. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36:453-483.
- van LOON, L.C.; C.M.J. PIETERSE; P.A.H.M. BAKKER; B.P.M.GERAATS; M. KNOESTE; J. TON, & SCM. VAN WEES. 2001. Systemically induced resistance in *Arabidopsis*. *Fitopatologia brasileira (suplemento)*, 26:254.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bactéria. *Annual Review of Phytophatology*, 26: 1508-15012.
- WHITEHEAD; A.G. 1997. Plant nematode control. CAB International, London, UK, 384p.

## CAPÍTULO I

### RESISTÊNCIA INDUZIDA POR *Rhizobium etli* A *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO

CLÉIA F.S. FABRY<sup>1</sup>, LEANDRO G. FREITAS<sup>1,3</sup>, MÁRCIO T. GODINHO<sup>1</sup>,  
WÂNIA S. NEVES<sup>1,2</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>1,3</sup>

\*Parte da tese de doutorado da primeira autora, bolsista CAPES,  
Universidade Federal de Viçosa E-mail: clfabry@hotmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000 Viçosa MG, Brasil

<sup>2</sup>Bolsista de doutorado do CNPq

<sup>3</sup>Bolsista de produtividade do CNPq

**Resumo:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; M.M. Godinho; W.S. Neves & S. Ferraz. 2005. Resistência Sistêmica induzida por *Rhizobium etli* a *Meloidogyne javanica* em tomateiro.

A bactéria *Rhizobium etli* isolado G12, obtida da rizosfera de plantas de batata para o controle de *Globodera pallida*, foi testada neste trabalho visando à indução de resistência sistêmica contra *Meloidogyne javanica* em plantas de tomate. Utilizou-se a técnica de sistema radicular bipartido em tomate para demonstrar o efeito sistêmico da bactéria. Metade do sistema radicular de cada planta foi inoculada com 5 mL de suspensão aquosa de células de *R. etli* G12, e a outra metade, em recipiente separado, foi inoculada, após 3, dias com 1.500 ovos do patógeno desafiante, *M. javanica*. Quarenta e cinco dias depois da inoculação do nematóide avaliaram-se a altura da parte aérea das plantas, o número de ovos e de galhas por sistema readicular. Não houve diferença estatística entre as médias de altura das plantas tratadas e das não tratadas, mas os números de galhas e de ovos por sistema radicular foram reduzidos em 35,3% e 38,8%, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação com *R. etli*.

**Palavras-chave:** rizobactéria, nematóide das galhas, controle biológico.

**Summary:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; M.M. Godinho; W.S. Neves & S. Ferraz. 2005. Systemic induced resistance by *Rhizobium etli* G12 against *Meloidogyne javanica* in tomato plant.

The isolate G12 of the bacterium *Rhizobium etli*, isolated from the rhizosphere of potato plants for the control of *Globodera pallida*, was tested in this work for the induction of systemic resistance against *Meloidogyne javanica* in tomato plants. The split-root system technique was used to demonstrate the systemic mode of the bacterium. One half of the root system of each tomato plant was inoculated with 5 mL of an aqueous suspension of cells of the resistance inductor, *R. etli* G12, and the other half, in a separate container, was inoculated 3 days after with 1,500 eggs of the defiant pathogen, *M. javanica*. Forty five days after, the the plant height, and number of galls and eggs per root system were evaluated. There was no statistical difference between plant height means of treated and for-treated plants, but gall and egg numbers per root system were reduced by 35,3% and 38,8%, respectively, in comparison to the control treatment.

**Key words:** rhizobacteria, root-knot nematode, biological control

## INTRODUÇÃO

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., compõem um dos grupos mais importantes de parasitas de plantas pois causam grandes reduções na produção agrícola (Sinclair & Backmann, 1993). Dentre os vários nematóides parasitas de plantas, o gênero *Meloidogyne* destaca-se como o principal responsável pelas perdas, pois ataca quase todas as culturas de interesse econômico (Sasser & Freckman, 1987). Métodos de controle alternativos ao uso de nematicidas vêm sendo cada vez mais estudados, a exemplo da a indução de resistência sistêmica. A indução é definida como o aumento da capacidade da defesa das plantas contra patógenos, adquirida após a ativação de mecanismos de resistência por diversos agentes, como ativadores químicos (Kunz *et al.*, 1997; Benhamou & Belanger, 1998) ou microrganismos vivos (Chen *et al.*, 1996; Hoffland *et al.*, 1996). Nesse último caso, quase sempre, os agentes são rizobactérias

promotoras do crescimento de plantas, também conhecidos por PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper & Schroth, 1978).

As rizobactérias podem atuar diretamente sobre os nematóides por meio de toxinas e antibióticos que inibem a eclosão e a mobilidade dos juvenis de segundo estágio, reduzindo a invasão dos nematóides nas raízes das plantas, e indiretamente, pelo desencadeamento de reações na planta que impedem a formação de células gigantes ou acarretam modificações dos exsudatos radiculares, fazendo com que eles não sejam reconhecidos pelos nematóides e deixem de estimular a eclosão, o movimento e a penetração nas raízes (Oostendorp & Sikora, 1990; Kerry, 2000; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Steiner e Schönbeck (1995) propuseram sete critérios para diferenciar o fenômeno de indução de resistência de outros mecanismos de biocontrole que reduzem a severidade e a incidência. Primeiramente deve haver ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante; supressão da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro, como a actinomicina D; necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência; não haver uma relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado, à semelhança do que se observa em casos típicos de uso de defensivos; inespecificidade da proteção; a resistência ser local e sistêmica; ser dependente do genótipo da planta.

A bactéria *Rhizobium etli* G12 previamente denominado *Agrobacterium radiobacter* isolado G12 foi isolada da rizosfera de plantas de batata por Günter e colaboradores em 1994 e utilizada para o controle do nematóide do cisto da batata, *Globodera pallida*. Seu potencial antagonístico foi associado à indução de resistência sistêmica por meio de utilização do método de sistema radicular bipartido (Hasky-Günter *et al.*, 1994). Em outro estudo, esta bactéria apresentou atividade antagonística contra o nematóide das galhas, *Meloidoyne incognita*, em diferentes plantas hospedeiras (Mahdy *et al.*, 2001). Constatada sua eficiência em estudos na Alemanha, este isolado bacteriano foi trazido ao Brasil e regulamentado de acordo com o processo número MAPA 21028.004176/2004-34 com o objetivo de avaliar a indução de resistência sistêmica contra a população local do nematóide das galhas, *M. javanica* em tomateiros.

## MATÉRIAL E MÉTODOS

**Produção de inóculo de *M. javanica*.** O nematóide das galhas, *M. javanica*, foi multiplicado em plantas de tomate mantidos em vasos em casa-de-vegetação, com solo previamente tratado com brometo de metila. Os ovos utilizados nos experimentos foram extraídos das raízes utilizando-se a técnica de Hussey & Barker adaptada por Boneti & Ferraz (1981).

**Preparo do inóculo bacteriano.** A cultura de *R. etli* isolado G12, foi riscada com alça de Drigalski sobre meio B de King (King *et al.* 1954) em placas de Petri e mantidas a 28°C durante 48h. Após esse período, fez-se a raspagem da cultura bacteriana e preparou-se uma suspensão aquosa ajustada para  $DO_{540} = 0,5$ .

**Ensaio em casa-de-vegetação.** Sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram semeadas em sementeira contendo substrato (Plantagro<sup>®</sup>) e cultivadas por aproximadamente 20 dias em casa-de-vegetação. Plântulas de aproximadamente 10 cm de altura, foram transplantadas para vasos com 1 L de substrato constituído de solo e areia na proporção 1:1 (v:v). Após 20 dias, quando as plantas estavam com aproximadamente 25 cm de altura, elas foram retiradas do substrato e preparadas para desenvolver sistema radicular bipartido segundo Olzem (2001). Para isso, as raízes foram eliminadas por meio de uma secção transversal da planta na região do coleto. Uma fenda longitudinal de, aproximadamente 8 cm foi aberta a partir da extremidade inferior do caule, sendo as pontas resultantes inseridas no substrato contidas em vasos geminados (Esquema 1) O período de enraizamento foi de 10 dias. Decorrido esse período, uma metade do sistema radicular da planta foi inoculada com 5 mL de suspensão do indutor de resistência, *R. etli* G12 e a outra com 1.500 ovos do patógeno desafiante, *M. javanica* onde utilizou se pipeta semi-automática. Para os tratamentos testemunhas, realizou-se também a técnica de raiz partida, porém não se inoculou *R. etli*. Quarenta e cinco dias após a infestação do solo, as seguintes variáveis foram avaliadas: altura das plantas, número de galhas e número de ovos por sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove repetições por tratamento. Os dados foram analisados por teste de F a 5% de propabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação de *Rizobium etli* G12 em uma das frações do sistema radicular do tomateiro resultou na diminuição do número de ovos e de galhas de *Meloidogyne javanica* em 38,81% e 35,34%, respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 1).

Muitas pesquisas demonstram que as rizobactérias atuam como indutoras de resistência sistêmica (Wei *et al.*, 1991; Tuzun *et al.*, 1992; Tuzun & Kloepper, 1995; Siddiqui & Shaukat, 2004). Entretanto, nem sempre são determinados os reais mecanismos de controle envolvidos. A ação direta de toxinas ou antibióticos sobre os patógenos é, muitas vezes o mecanismo mais freqüente quando se usam bactérias para o controle biológico. Steiner e Schönbeck (1995) propuseram critérios para diferenciar o fenômeno de indução de resistência de outros mecanismos de biocontrole que reduzem a severidade e a incidência de doenças de plantas. Primeiramente deve haver ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante, que só pode ser percebido se houver uma separação espacial entre eles. Para isso deve-se recorrer a técnicas que forcem a separação espacial, como por exemplo, a utilização de sistema radicular bipartido. Quando a bactéria está presente numa parte separada da raiz e o nematóide noutra parte em outro recipiente temos claro que os efeitos são indiretos e devem ser translocados pela planta de forma sistêmica. No presente trabalho, essa técnica foi utilizada para separar espacialmente *R. etli* G12 de *M. javanica*, verificando-se assim, a indução de resistência sistêmica pela bactéria na planta. Outro critério abordado por Steiner e Schönbeck (1995) é a aplicação do indutor previamente à inoculação com o desafiante, para que haja tempo dos genes da planta que codificam a resistência induzida serem ativados e expressa. Em terceiro lugar a resistência sistêmica também deve ser dependente do genótipo da planta (van Loon *et al.*, 1998) o que foi observado com esse isolado bacteriano G12 em trabalho prévio de Mahdy *et al.* (2001). Ao estudarem a atividade antagonista de *R. etli* G12 contra *M. incognita* em diferentes espécies vegetais, estes autores observaram que o nível de controle variou dependendo do hospedeiro. A redução de galhas nas plantas de tomateiro foi de 50 %, valor superior ao controle em pepino, pimenta, soja e algodão, sendo que, neste último, o resultado foi de apenas 17% de controle do nematóide. Por último, a indução de resistência sistêmica deve conferir proteção generalizada contra ampla gama de patógenos. Apesar de só ter sido testada para fitonematóides, com os resultados obtidos no presente trabalho,

número de espécies controladas por *R. etli* G12 contata no momento de três, *M. javanica*, *M. incognita* e *G. pallida* (Hasky-Günter *et al.*, 1994; Mahdy *et al.*, 2001).

Geralmente as rizobactérias promovem o crescimento, o vigor e o aumento de produtividade de plantas (Chen *et al.*, 1996) através de mecanismos não relacionados com a bioproteção (Lifshitz *et al.*, 1988). Vonderwell *et al.* (2001) observaram o aumento da concentração de ácido indol-acético (IAA) em plântulas de *Pinus taeda* L. inoculadas com *Bacillus subtilis* isolado INR7. *Pseudomonas fluorescens* é outro exemplo de rizobactéria que produz auxina (Boronin *et al.*, 1993). Entretanto, nesse trabalho não se observou aumento no desenvolvimento da parte aérea das plantas (Figura 2). Sikora (1988) também não observou alteração significativa no peso das raízes e da parte aérea das plantas de algodão, amendoim e beterraba açucareira tratadas com *B. subtilis*. No entanto, houve atividade antagonística contra *M. incognita* em algodão e beterraba açucareira, contra *M. arenaria* em amendoim e *Rotylenchulus reniformis* em algodão.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que *R. etli* G12 induz a resistência sistêmica em plantas de tomateiro a *M. javanica*, porém nas condições aqui estudadas não se observou efeito sobre o crescimento das plantas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENHAMOU, N. & R.R. BELANGER, 1998. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant Journal*, 14: 13-21.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6:553.
- BORONIN, A.M.; V.V. KOCHETKOV; A.N. DUBEIKOVSKY & E.A. MORDUKHOVA. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by PGPR *Pseudomonas* isolated in Russia. In: VI International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, International Society of Plant Pathology, p. 276 (abstr.).
- CHEN, Y.; R. MEI; L. LIU & J.W. KLOPPER. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R. S. & Gupta, V. K. (Eds). *Management of Soil Born Diseases*. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996. Chapter 8, 165-184
- HASKY-GÜNTHER, K.; S. HOFMANN-HERGARTEN & R.A. SIKORA. 1998. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundamental and Applied Nematology*, 21: 511-517.
- HOFFLAND, E.; J. HAKULINEN; J.A. VAN PELT & J. A. VAN PELT. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology*, 86: 757-762.
- KERRY, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 38:423-441.
- KING, E.O.; M.K. WARD & D.E. RANEY. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44:301-307.
- KLOPPER, J.W. & M.N. SCHROTH. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, ed. Station de Pathologie Vegetal et Phytopbacteriologie, 2:879-882. Angers, France.
- KLOPPER, J.W.; R.M. ZABLOTOWICZ & R. LIFSHITZ. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. 1990. p. 315-326 In: Keister, D.I. and Cregan, P.B. eds. *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht, Academic Publishes.

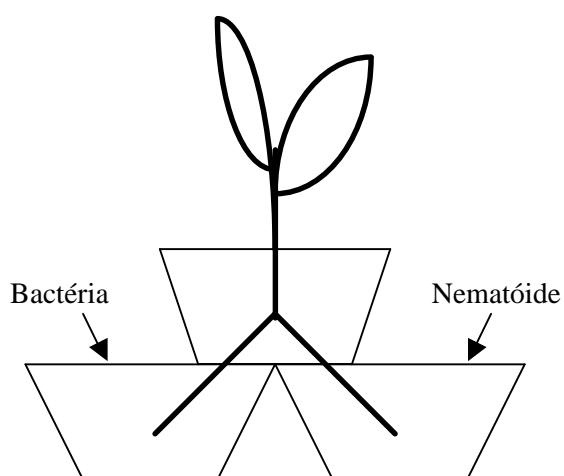
- KUNZ, W.; R. SCHURTER. & T. MAETZKE. 1997. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science*, 50: 275-282.
- LIFSHITZ, R.; H. GUILMETTE & M. KOZLOWSKI. 1988. Tn5-mediated cloning of a genetic region from *Pseudomonas putida* involved in the stimulation of plant root elongation. *Applied Environment Microbiology*, 54:3169-3172.
- MAHDY, M; J. HALLMANN & R.A. SIKORA. 2001. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66(2b): 655-662.
- OLZEM, B. 2001. Wirksamkeit und Wirkungsweisen von Rhizosphärebakterien gegen den Wurzelgallenematoden *Meloidogyne incognita* an Tomate. Diplom arbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Review Nematology*, 14:269-274.
- RAMAMOORTHY, V.; R. VISWANATHAN; T. RAGUCHANDER; V. PRAKASAM & R. SEMIYAPPAN. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants pests and diseases. *Crop Protection*, 20: 1-11.
- SASSER, J.N. & FRECKMAN, D.W., 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. Pp. 7-14, *In: VEECH, J.A. & D.W. DICKSON (ed.). Vistas on Nematology*, Maryland: Society of Nematologists.
- SASSER, J.N. 1989. Plant-parasitic nematodes: The farmer's hidden enemy. University Graphics. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 115p.
- SIDDIQUI I. A. & S.S. SHAUKAT. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*, 152(1): 48-54.
- SINCLAIR, J.B. & P.A. BACKMANN. 1993. (Eds.) *Compendium of soybean diseases*. 3. ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 106p.
- SIKORA, R.A. 1988. Interrelations between plant health promoting rhizobacteria plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 53:867-878.
- STEINER, U. & F. SCHÖNBECK. 1995. Induced disease in monocots. *In: Hammerschmidt, R. & Kuc, J. (Eds.). Induced resistance to disease in plants In: Development in Plant Pathology*, vol. 4. Kluwer Academic Pub., Dordrech. pp.86-110.

- TUZUN, S; J. JUAREZ; W.C. NESMITH & J. KUC. 1992. Induction of systemic resistance in tobacco against metalaxyl-tolerant strains of *Peronospora tabacina* and the natural occurrence of the phenomenon in Mexico. *Phytopathology*, 82: 425-429.
- TUZUN, S. & J. W. KLOEPPER. 1995. Potential Applications of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Induced Systemic Disease Resistance. In: Reuveni, R. (Eds). *Novel Approaches to Integrated Pest Management*. Boca Raton: Lewis Publishers, p115-127.
- VAN LOON, L.C.; P.A.H.M. BAKKER. & C.M.J. PIETERSE. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- VONDERWELL, J.D.; S.A. ENEBAK & L.J. SAMUELSON. 2001. Influence of two growth-promoting rhizobacteria on loblolly pine root respiration and IAA activity. *Forest Science*, 47 (2):197-202.
- WEI, G.; J. W. KLOEPPER, & S. TUZUN. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, 86: 221-224.

Tabela 1 – Controle de *Meloidogyne javanica* por *Rhizobium etli* em tomateiro em sistema de raiz partida

Tratamentos	Observado (médias)		Reduções	
	ovos	galhas	ovos	galhas
<i>M. javanica</i>	152627,8	283,55		
<i>M. javanica</i> + <i>R. etli</i>	93383,3	183,44	38,81%	35,34%

Esquema 1 – Técnica de raiz partida em tomateiro inoculados com *R. etli* visando o controle de *M. javanica*.



## CAPÍTULO II

### OTIMIZAÇÃO DO BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E *Meloidogyne javanica* POR *Rhizobium etli* COM A UTILIZAÇÃO DE HÚMUS

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY<sup>1</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>1</sup>;  
EVERALDO ANTÔNIO LOPES<sup>1</sup>, LUIZ ANTÔNIO DIAS<sup>1</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa MG, Brasil.

\*Parte da tese de doutorado da primeira autora apresentada à Universidade Federal de Viçosa (Bolsista da CAPES)

**Resumo:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; E.A. Lopes; L.A. Dias; & S. Ferraz. 2006. Otimização do biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* por *Rhizobium etli* com a utilização de húmus.

Verificou-se a otimização da bactéria *Rhizobium etli* para o biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* pela adição de húmus ao solo. Sementes de tomate Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas por imersão em suspensão aquosa da bactéria *R. etli* e semeadas em mistura de solo e areia 1:1 (v: v), com adição e homogeneização prévias de húmus de minhoca nas concentrações de 0, 50 e 150 g/vaso para *M. incognita* e 0, 50, 100, 150 e 200 g/vaso para *M. javanica*. Após três semanas, as plantas foram inoculadas com 2.000 ovos de *M. incognita* ou *M. javanica*. Após 60 dias da inoculação, mediram-se a altura e o peso da biomassa verde da parte aérea das plantas e contou-se o número de galhas e de ovos presentes no sistema radicular. A aplicação de húmus apenas, nas duas concentrações testadas, não resultou no controle de *M. incognita*, ao passo que a utilização conjunta de húmus e *R. etli* promoveu aumentos significativos no peso da biomassa verde das plantas em 82 e 104% para as doses de húmus 50 e 150 g respectivamente. Nessas mesmas concentrações, os aumentos na altura foram de 45 e 44% e as reduções no número de galhas de 54 e 64% respectivamente. Não se observou diferença significativa nas reduções do número de ovos. Para *M. javanica*, com a inoculação de *R. etli* o número de ovos foi reduzido em 70, 51, 65 e 72% e de galhas em 57, 52, 46 e 38% para as doses de 50, 100, 150 e 200 g

de húmus por vaso, respectivamente. Aumentos significativos no peso da biomassa da parte aérea para a interação *R. etli* e húmus não foram observados no ensaio com esse nematóide.

**Palavras-chave:** rizobactéria, nematóide das galhas, matéria orgânica, húmus, biocontrole.

**Summary:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; L.A. Dias; E.A. Lopes & S. Ferraz. 2006. Enhancement of the biocontrol of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Rhizobium etli* with humus.

In this work evaluated the enhancement of the biocontrol of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Rhizobium etli* with the addition of humus into the soil. Tomato seeds Santa Cruz 'Kada' were soaked in a bacterial cell suspension of *R. etli* and sowed in the substrate, a mixture of soil and sand 1:1 (v:v), with humus previously added and homogenized at the rates of 0, 50, 150 g/pot for *M. incognita* and 0, 50, 100, 150 200 g/pot with for *M. javanica*. After three weeks each plant, was inoculated with 2000 eggs of *M. incognita* or *M. javanica*. Sixty days after inoculation, the plant height, the weight of the above-ground part, the numbers of galls, eggs per root were evaluated. For *M. incognita*, there was no statistical difference between the two levels of humus tested. Humus application alone, in either concentration, did not result in the control of *M. incognita*, while the use of humus with *R. etli* promoted a significant increase in the weight of the plant above-ground part in 82% and 104% for the doses 50 and 150 g respectively. In those same concentrations, the increases in the height were respectively of 45 and 44% and the reductions in the galls number was 54 and 64%. Significant difference was not observed in the reductions of the number of eggs. For *M. javanica*, with the inoculation of *R. etli*, the number of eggs was reduced by 70%, 51%, 65% and 72%, and the number of galls per root system by 57%, 52% 46% and 38% for the doses of 50, 100, 150 and 200 g of humus per pot, respectively. Significant increases in the weight of the biomass of the aerial part for the interaction *R. etli* and humus was not observed in the essay with this nematode.

**Key-words:** rhizobacteria, gall nematode, organic matter, humus, biocontrol.

## INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas causam grandes perdas na produção agrícola, sendo os pertencentes ao gênero *Meloidogyne* considerados os mais importantes devido à grande capacidade de adaptação aos mais diversos agrossistemas e por parasitarem ampla gama de hospedeiros (Sinclair & Backmann, 1993).

Os nematicidas são empregados no controle de nematóides, porém muitas vezes sua eficiência é baixa, a exemplo do fumigante 1,3 dichloropropene (Ou *et al.*, 1995), do fosforado fenamifós (Davis *et al.*, 1993) e do carbamato aldicarbe (McLean & Lawrence, 2003), sendo perigosos para animais e seres humanos, devido à elevada toxicidade e resistência nos ecossistemas (Becker *et al.*, 1988). A retirada dos nematicidas de primeira geração do mercado, devido a contaminações do lençol freático e do brometo de metila, por causa de danos à camada de ozônio, sem o desenvolvimento de novas formulações de nematicidas mais seguras e eficientes, levam à busca de métodos alternativos para o manejo destes patógenos, a exemplo do controle biológico, por meio da seleção de agentes eficientes e, ou, do manejo do ecossistema para promover a sua atuação.

Dentre os microrganismos para o biocontrole de fitonematóides, destacam-se as bactérias que colonizam a rizosfera e induzem resistência sistêmica a diversos fitopatógenos, as rizobactérias. Esses organismos também são chamados bactérias promotoras de crescimento de plantas (=PGPR, que são as iniciais do termo em inglês), quando estimularem o crescimento vegetal (Klopper, 1994, Kloepper & Schroth, 1978; Teixeira *et al.*, 2005). A maioria das rizobactérias pertence ao gênero *Pseudomonas* ou *Bacillus*, mas também são relatadas as espécies de outros gêneros, como por exemplo, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Azospirillum* (Benizri *et al.*, 2001). A ação desses organismos sobre os fitonematóides pode ser de forma direta, afetando a eclosão dos ovos e a mobilidade dos juvenis, ou indireta, pela alteração dos exudatos radiculares e indução de resistência sistêmica (Hasky-Günter *et al.*, 1998; Sikora & Hoffmann-Hergarten, 1992).

A incorporação de resíduos orgânicos como manejo do solo, além de melhorar a estrutura e a fertilidade do solo, estimula a atividade de microrganismos antagonistas a fitonematóides (Akhtar & Malik, 2000). Material quitinoso adicionado ao solo estimula bactérias e actinomicetos quitinolítica (Culbreath *et al.*, 1985, Hallmann *et*

*al.*, 1999). A aplicação de húmus ao solo também parece ter papel importante no estímulo da atividade microbiana. Além de disponibilizar micro e macronutrientes, para as raízes das plantas, o húmus aumenta a eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio (Soares *et al.*, 2004). O húmus é uma fração estável da matéria orgânica do solo resultante da decomposição de grande parcela de resíduos vegetais e animais adicionados. A composição do húmus é desconhecida, mas sabe-se que é formada por um complexo de produtos fenólicos, polissacarídeos e proteínas (Wagner & Wolf, 1998) que podem servir de substrato para o desenvolvimento bacteriano. Elo *et al.* (2000) isolaram das camadas de húmus de floresta de coníferas (*Picea abies* L.) na Noruega, os gêneros de rizobactérias *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Pseudomonas*, sendo que *Pseudomonas* e *Bacillus* eficientes foram antagonistas a isolado de *Rhizoctonia* sp.

A bactéria *Rhizobium etli* G12, inicialmente identificada com *Agrobacterium radiobacter* G12 (Hasky-Günter *et al.*, 1998), foi isolada da rizosfera de plantas de batata, teve sua eficiência constatada em estudos na Alemanha foi trazida ao Brasil e regulamentado de acordo com o processo número MAPA 21028.004176/2004-34. Nesse trabalho objetivou-se avaliar o efeito de húmus em diferentes doses em conjunto com *R. etli* G12, para verificar a indução de resistência sistêmica contra população local do nematóide das galhas, *M. incognita* e *M. javanica* em tomateiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Produção de inóculo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*.** Os nematóides das galhas, *M. javanica* e *M. incognita* foram multiplicados em tomateiros mantidos em vasos em casa-de-vegetação, com solo previamente tratado com brometo de metila. Os ovos utilizados nos experimentos foram extraídos das raízes dos tomateiros pela técnica de Hussey & Barker adaptado por Boneti & Ferraz (1981).

**Preparo do inóculo bacteriano.** A cultura de *R. etli* G12 foi repicada com alça de Drigalski sobre meio B de King (King *et al.*, 1954) em placas de Petri e mantidas a 28°C durante 48h. Após esse período, raspou-se a cultura bacteriana e preparou-se uma



suspensão aquosa ajustada para  $OD_{540} = 0,5$ . Sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas utilizando-se o método descrito por Oostendorp & Sikora (1989), modificado para 24 h de imersão e incubação em temperatura ambiente no laboratório ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Para o tratamento testemunha, as sementes foram submersas em água destilada por 24 h no lugar de suspensão bacteriana.

**Ensaio em casa-de-vegetação.** Foram realizados dois ensaios em casa-de-vegetação. No primeiro utilizou-se como patógeno desafiante, o nematóide *M. incognita*. Para isso, uma mistura de solo e areia na proporção 1:1 (v:v) foi homogeneizada com húmus de minhoca de forma a resultar nas quantidades de 0, 50 e 150 g de húmus/vaso com 1,5 L de substrato. No segundo ensaio, o patógeno utilizado foi *M. javanica* e o procedimento foi o mesmo, porém, em concentrações mais escalonadas de húmus de 0, 50, 100, 150 e 200 g/vaso. Em ambos os ensaios, as sementes microbiolizadas foram semeadas e após três semanas, cada planta, foi inoculada com 2.000 ovos de *M. incognita* ou *M. javanica*. Passados 60 dias da inoculação, avaliaram-se a altura e o peso da biomassa verde da parte aérea das plantas, o número de galhas e de ovos por sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete repetições por tratamento.

**Análise estatística.** Efetuou-se a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio com *M. incognita*, não se observou diferença estatística dentro das doses testadas, e sim entre as doses. A aplicação de húmus apenas, em ambas as concentrações, não resultou em aumentos da biomassa verde das plantas, ao passo que a utilização conjunta de húmus e *R. etli* promoveu aumento significativo do peso da parte aérea das plantas de 82 e 104% nos tratamentos com 50 e 150 g/vaso de húmus respectivamente (Figura 1). Constatou-se também, incrementos em alturas de 45% e 44% nas doses testadas (Figura 2). Reduções significativas no número de galhas com a

inoculação de *R. etli* foram alcançadas na magnitude de 54 e 64% para 50 e 150 g, respectivamente, quando comparadas com o tratamento sem aplicação de húmus. Na ausência de *R. etli*, a incorporação de húmus não reduziu significativamente o número de galhas causadas pelo nematóide (Figura 3). Entretanto, a diferença significativa do efeito das doses dentro do tratamento com *R. etli* ocorreu somente para a dose 150 g. O número de ovos não diferiu estatisticamente com a incorporação de húmus e a inoculação de *R. etli*.

No segundo experimento, não se observou efeito significativo da aplicação de húmus associado com *R. etli* na altura das plantas e na massa fresca parte aérea. Entretanto, as doses de húmus, na ausência de *R. etli* aumentaram o peso da massa fresca parte aérea (figuras 4 e 5). A incorporação de húmus junto com a aplicação de *R. etli* promoveu reduções no número de ovos e galhas por sistema radicular para todas as doses de húmus. Essas reduções foram nas proporções de 70, 51, 65 e 72% no número de ovos e em 57, 52, 46 e 38% no número de galhas para as doses 50, 100, 150 e 200g de húmus por vaso, respectivamente (Figuras 6 e 7). Todavia, não houve redução de sintomas e da reprodução de *M. javanica* com a aplicação *R. etli* na ausência de húmus. Já o número de galhas, ovos, altura e massa fresca das plantas aumentaram significativamente em comparação com a testemunha sem húmus.

Nota-se que a incorporação de húmus ao solo, junto com a inoculação de *R. etli*, resultou em benefícios para as plantas e aumentou a eficiência da bactéria no controle de *M. javanica* e *M. incognita*. Provavelmente o efeito do húmus está relacionado ao estímulo da atividade antagonística de *R. etli* a ambos os nematóides. Siddiqui *et al.* (2001) testaram dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* em combinação com a adição de esterco de vaca e fertilizante inorgânico, visando ao manejo de *M. incognita* em tomateiro e verificaram reduções no número de galhas e promoção de crescimento das plantas. O uso de matéria orgânica combinada com *P. fluorescens* foi melhor do que com a aplicação de fertilizante inorgânico.

Lindford, *et al.* (1938) afirmam que a adição de material orgânico ao solo estimula a atividade da microbiota natural do solo e normalmente esses microrganismos possuem efeito antagonístico a fitonematóides. A adição de material orgânico propicia a formação e a estabilização dos agregados que condicionam a infiltração e a drenagem de água do solo criando um habitat favorável para a microbiota composta de fungos, bactérias e actinomicetos. Infere-se que o efeito do húmus sobre a bactéria aqui testada seja análogo ao efeito de outros tipos de matérias orgânicas que estimulam a

proliferação dos mais diversos gêneros de bactérias do solo. Provavelmente, os nutrientes liberados pelo húmus na rizosfera oferecem suplemento para a multiplicação das rizobactérias, auxiliando na colonização das raízes das plantas pelas mesmas. Elo *et al.* (2000) selecionaram isolados das camadas de húmus em florestas e verificaram que alguns gêneros de rizobactérias encontrados apresentaram grande potencial antagonístico a fitopatógenos.

Neste trabalho, não se observou diferença entre os teores de húmus incorporados aos vasos sobre a eficiência *R. etli*, sendo que todas as doses ocasionaram reduções significativas do número de ovos e galhas de *M. javanica*. Porém, no ensaio com *M. incognita* observou-se um melhor desempenho da bactéria na redução de galhas com a maior dose de húmus. Akhtar & Malik (2000) preconizam existir uma quantidade ideal de suplemento orgânico que estimule a população microbiana no solo. Contudo, o tipo de matéria orgânica possui importância fundamental no favorecimento de determinados microrganismos. Como exemplo, a adição de compostos quitinosos ao solo, estimulou marcadamente as populações de bactérias e actinomicetes, especialmente as formas quitinolíticas as quais foram efetivas na redução de juvenis de *M. incognita* (Mankau & Das, 1969). Hallmann *et al.* (1999) também observaram que adição de resíduo quitinoso ao solo, resultou na supressividade do solo a fitonematóides e em mudanças na sua comunidade microbiana do mesmo.

O emprego do húmus associado a *R. etli* resultou em aumento na biomassa da parte aérea das plantas nos ensaios com ambos os nematóides e em aumento na altura da parte aérea no experimento com *M. incognita*. O aumento no peso e a promoção de crescimento das plantas por rizobactérias já foram relatados por vários autores (Chen *et al.*, 1996; Luz, 1996.). Çakmakçi *et al.* (2005) investigaram a promoção de crescimento em beterraba açucareira por PGPR em dois tipos de solos orgânicos. Os autores concluíram que a promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias e o aumento da folhagem foram fortemente dependentes da matéria orgânica contida no solo, pois os compostos orgânicos podem ser usados com fonte de energia e carbono pelas bactérias. Os benefícios do húmus às plantas estão relacionados aqueles resultantes da matéria orgânica, fornecendo nutrientes às plantas e melhorando a qualidade do solo. Não obstante, nesses ensaios, a aplicação de húmus não demonstrou nenhuma relação no controle de ambos nematóides. Provavelmente, não há liberação de compostos que sejam tóxicos para os fitonematóides pela incorporação de húmus.

Esses dados confirmam que a aplicação de húmus ao solo potencializa o efeito antagonístico de *R. etli* no controle de *M. incognita* e *M. javanica*. Presume-se que o fator considerável para o controle de *M. javanica* possivelmente seja o tipo de material aplicado ao solo, no caso o húmus, e não a quantidade. Entretanto, o modo de ação do húmus e os fatores que levam ao estímulo de microrganismos antagonistas ainda são bastante complexos e necessitam de mais estudos para melhor entendimento. Provavelmente o crescimento e a multiplicação de *R. etli* foram favorecidos pelas substâncias liberadas pelo húmus, tais como polissacarídeos e proteínas, as quais podem ser utilizadas com fonte de energia e carbono pela bactéria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M. & A. MALIK, 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 74(1):35-47.
- BECKER, J.O.; E. ZAVALETA-MEJIA; S.F. COLBERT; M.N. SCHROTH; A.R. WEINHOLD; J.G. HANCOCK; S.D.V. GUNDY & S.D. VAN-GUNDY. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, 78:1466-1469.
- BENIZRI, E.; E.BAUDOIN. & A. GUCKERT. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 11:557-574.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6 (Suplemento):553 (Resumo).
- ÇAKMAKÇI, R.; F. DÖNMEZ; A. AYDIN & F. SAHIN. 2005. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biochemistry*, 1-6.
- CHEN, Y; MEI, R; LIU, L. & KLOEPPER, J.W. 1996. The use of yield increasing (YIB) as plant growth - promoting rhizobacteria in chinese agriculture. Chapter 8, pg: 165-184, IN: Utkhede, R.S. & Gupta, V.K (Eds). *Management of Soil Born Disease*. Kalyani Publishers, Ludhiana.

- CULBREATH, A.K.; R. RODRÍGUEZ-KÁBANA & G. MORGAN-JONES, 1985. The use of hemicellulosic waste matter for reduction of the phytotoxic effects of chitin and control of root-knot nematodes. *Nematropica*, 15:49-75.
- DAVIS, R. F., A. W. JOHNSON & R. D. WAUCHOPE. 1993. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. *Journal of Nematology*, 25:679-685
- ELO, S. L. MAUNUKSELA; M. SALKINOJA-SALONEN & K. HAAHTELA. 2000. Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting proprieties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiology Ecology*, 31:143-152.
- HALLMANN, J.; R. RODRÍGUEZ-KÁBANA & J.W. KLOEPPER. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:551-560.
- HASKY-GÜNTHER, K.; S. HOFMANN-HERGARTEN & R.A. SIKORA. 1998. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundamental and Applied Nematology*, 21:511-517.
- KLOEPPER, J.W. & M.N. SCHROTH. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, ed. Station de Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie, 2:879-882. Angers, France.
- KLOEPPER, J.W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum* plant associations. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 137-166.
- KING, E.O.; M.K. WARD & D.E. RANEY. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44:301-307.
- LINFORD, M.B.; F. YAP & J.M. OLIVEIRA. 1938. Reduction of soil populations of root-knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil Science*, 127-141.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4:1-47.
- MANKAU, R. & S. DAS. 1969. The influence of chitin amendments on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 1:15-16.
- MCLEAN, K. S. & G. W. LAWRENCE. 2003. Efficacy of aldicarb to *Rotylenchulus reniformis* and biodegradation in cotton field soils. *Journal of Nematology*, 35:65-72.

- OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1989. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. *Revue de Nématologie*, 12(1):77-83.
- OU, L. T., K. Y. CHUNG, J. E. THOMAS, T. A. OBREZA & D. W. DICKSON. 1995. Degradation of 1,3-dichloropropene (1,3-D) in soils with different histories of field application of 1,3-D. *Journal of Nematology*, 27:249-257.
- SIDDIQUI, Z.A.; A. IQBAL. & I. MARMOOD. 2001. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Applied Soil Ecology*, 16: 179-185.
- SINCLAIR, J.B. & P.A. BACKMANN. 1993. (ed) Compendium of soybean diseases. 3. ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 106p.
- SOARES, J.P.; J.A. SOUZA & E.T. G. CAVALHEIRO. 2004. Caracterização de amostras comerciais de vermicompostos de esterco bovino e avaliação da influência do pH e do tempo na adsorção de Co (II), Zn (II) e Cu (II). *Química Nova*, 27(1):5-9.
- TEXEIRA, D.A.; A.C. ALFENAS; R.G. MAFIA; L.A. MAFIA, & E.M. FERREIRA. 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4):350-356.
- WAGNER, G.H. & D.C. WOLF. 1998. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: D. M. Sylvia; J.J. Fuhrmann; P.G. Hartel & D.A. Zuberer (ed). Prentice Hall Inc, Upper Saddle River, New Jersey Principles and Applications of Soil Microbiology, p. 218-258.

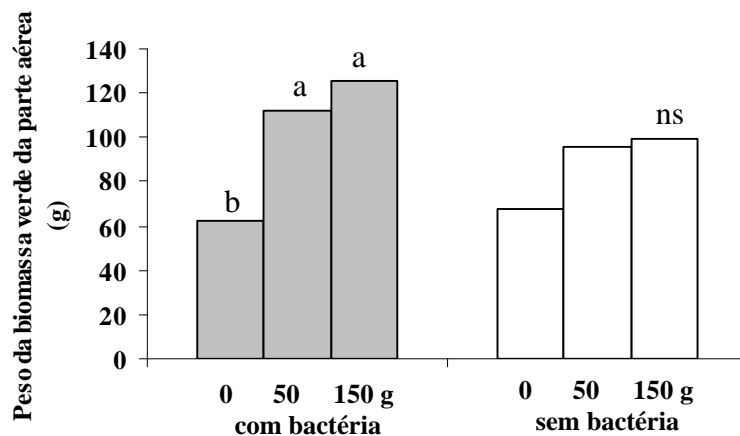


Figura 1 – Biomassa verde da parte aérea de tomateiro cultivados por 75 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne incognita*, aos 60 dias após a infestação do solo com 2000 ovos. Barras com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

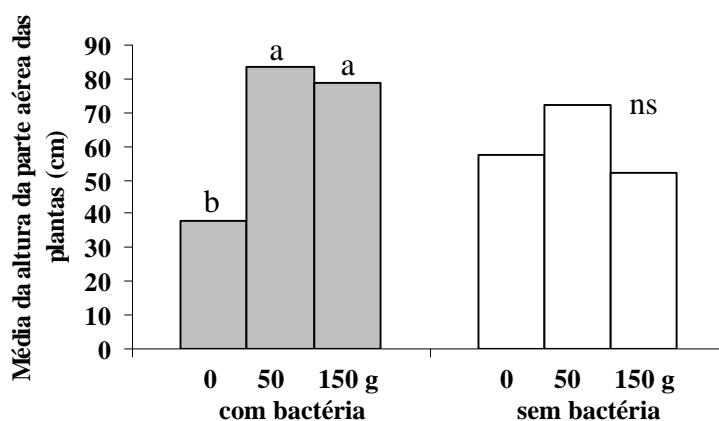


Figura 2 – Altura da parte da aérea de tomateiro cultivados por 75 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne incognita*, aos 60 dias após a infestação do solo com 2000 ovos. Barras com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

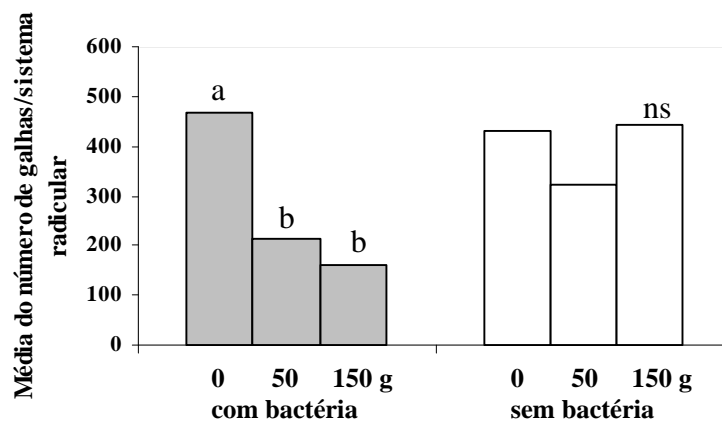


Figura 3 – Número de galhas de raízes de tomateiro cultivados por 75 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne incognita*, aos 60 dias após a infestação do solo com 2000 ovos. Barras com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

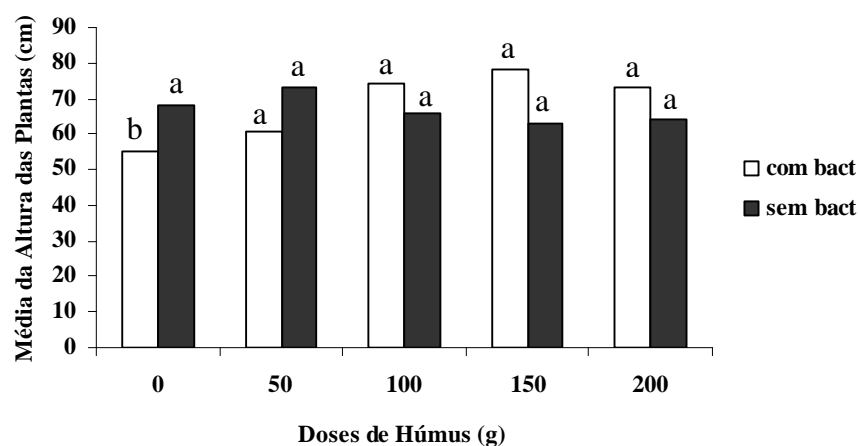


Figura 4 – Altura da parte aérea de tomateiro cultivado por 60 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos quarenta e cinco dias após a inoculação com 2000 ovos. Barras comparadas duas a duas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



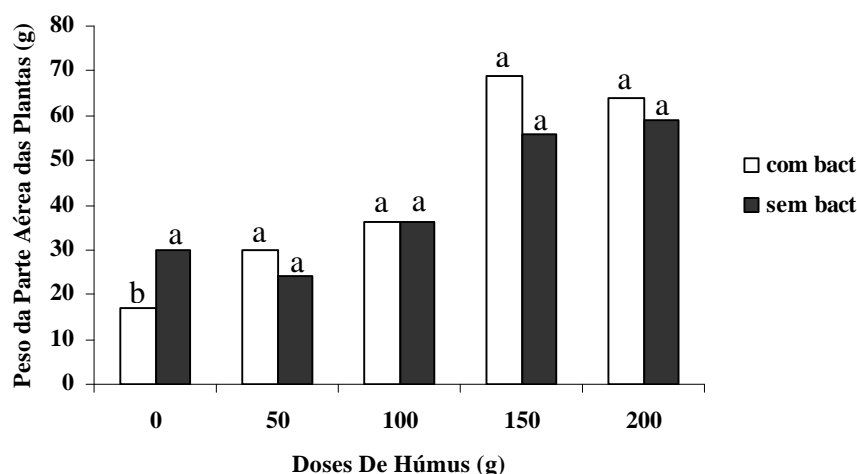


Figura 5 – Peso da biomassa verde de tomateiro cultivado por 60 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos quarenta e cinco dias após a inoculação com 2000 ovos. Barras comparadas duas a duas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

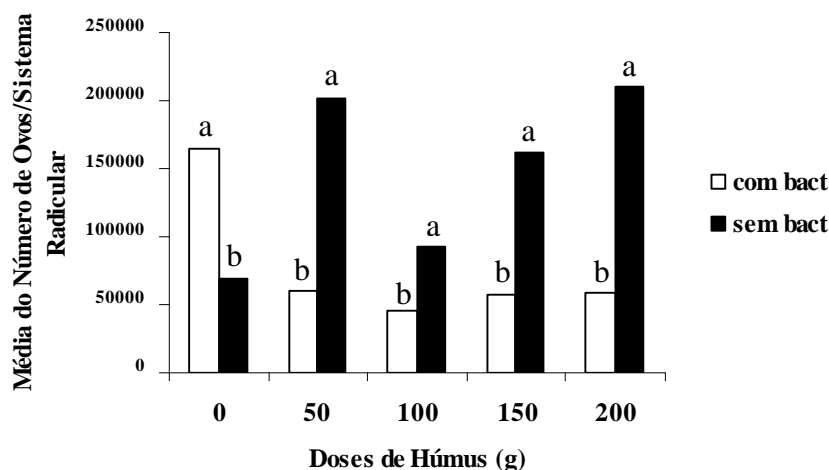


Figura 6 – Número de ovos em raízes de tomateiro cultivado por 60 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne javanica*, quarenta e cinco dias após a inoculação com 2000 ovos. Barras comparadas duas a duas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

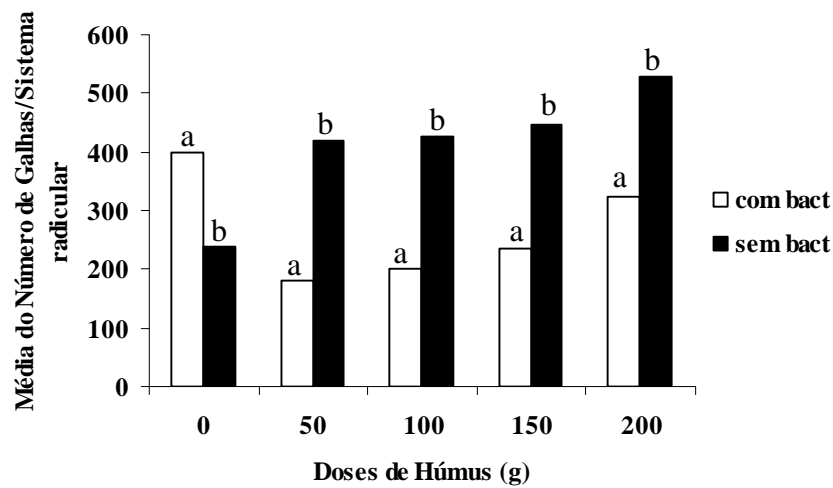


Figura 7 – Número de galhas em raízes de tomateiro cultivado por 60 dias em mistura de solo - areia (1:1) adicionada de diferentes doses de húmus de minhoca, inoculadas ou não de *Rhizobium etli* visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos quarenta e cinco dias após a inoculação com 2000 ovos. Barras comparadas duas a duas com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### CAPÍTULO III

#### EFICIÊNCIA DE *Rhizobium etli* COMO AGENTE DE BIOCONTROLE EM DIFERENTES NÍVEIS POPULACIONAIS DE *Meloidogyne javanica* E *Meloidogyne incognita*\*

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY<sup>1</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>1</sup>;  
RONALDO JOÃO FALCÃO ZOOCA<sup>1</sup>; ROSANGELA DALLEMOLE-GIARETTA<sup>1</sup>  
& SILAMAR FERRAZ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa MG, Brasil.  
\*Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Viçosa (Bolsista da  
CAPES)

**Resumo:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; R.J.F. Zooca; R. Dallemole-Giaretta. & S. Ferraz. 2006. Eficiência de *Rhizobium etli* como agente de controle biológico em diferentes níveis populacionais de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*.

Avaliou-se o potencial de *Rhizobium etli* no biocontrole de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* em diferentes densidades de inóculo desses patógenos em dois experimentos. No primeiro ensaio utilizou-se a técnica de sistema radicular partido em tomate para demonstrar o efeito sistêmico da bactéria. Metade do sistema radicular de cada planta foi inoculada com 5 mL de suspensão aquosa de células do indutor de resistência, *R. etli* G12, e a outra metade, em recipiente separado, foi inoculada, após 3 dias, com 2.000, 3.000 ou 4.000 ovos do patógeno desafiante, *M. javanica*. Quarenta e cinco dias depois da inoculação do nematóide, avaliaram-se altura da parte aérea das plantas e número de ovos e de galhas por sistema radicular. No segundo ensaio, sementes de tomate Santa Cruz ‘Kada’ foram microbiolizadas por imersão em suspensão aquosa da bactéria *R. etli* e foram semeadas em vasos contendo 1,5 L de uma mistura de solo e areia 1:1 (v:v). Após 20 dias, o solo de cada vaso foi infestado com 2 mL de suspensões contendo 2.000, 3.000 ou 4.000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita* e, 45 dias depois, avaliaram-se a altura das plantas e o número de galhas e de ovos por sistema radicular. O experimento foi inteiramente casualizado e constou de sete

repetições por tratamento. No primeiro ensaio observou-se reduções para o número de ovos em 40 e 51%, para os níveis de inóculo 3.000 e 4.000, respectivamente, com a aplicação de *R. etli* e não houve diferença significativa para o número de galhas e altura da parte aérea das plantas. Resultados significativos também não foram observados em nenhum dos tratamentos na ausência de *Rhizobium etli*. No segundo ensaio com *M. javanica*, para os níveis de inóculo de 2.000 e 4.000 ovos, observaram-se reduções significativas de 56% e 41% no número de ovos, respectivamente, com a aplicação de *R. etli*. A redução de 65% no número de galhas também foi observada na concentração de 2.000 ovos/vaso. Quanto a *M. incognita*, observou-se o aumento significativo de 29% na altura das plantas com a aplicação de *R. etli*, na densidade de 3.000 ovos do nematóide por vaso. O número de galhas foi reduzido em 63% e 35% quando se aplicou *R. etli* nas densidades de inóculo de 2.000 e 4.000 ovos/vaso, respectivamente. Não se observou diferença significativa para o número de ovos em nenhum dos tratamentos.

**Palavras-chave:** rizobactérias, nematóide das galhas, densidade de inóculo.

**Summary:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; R.J.F. Zooca; R. Giaretta-Dallemole & S. Ferraz. 2006. Efficiency of *Rhizobium etli* as biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* at different population levels.

The potential of *Rhizobium etli* for the biocontrol of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* was evaluated at different inoculum levels of the pathogen in two experiments. In the first one, split-root system of tomato was used to demonstrate the systemic induced resistance by the bacterium. One half of the root system of each plant was inoculated with 5 mL of aqueous suspension of cells of the resistance inducer, *Rhizobium etli* G12 and the other half, in a separate container, was inoculated after 3 days with 2000, 3000 or 4000 eggs of the defiant pathogen, *M. javanica*. Forty five days after the inoculation of the nematode inoculation, plant height and number of eggs and galls per root system were evaluated. In the second experiment, Santa Cruz 'Kada' tomato seeds were soaked in a suspension of *R. etli* and sowed in pots with 1,5 L of substrate composed of soil and sand 1:1 (v:v). Twenty days after, the soil of each pot was infested with 2 mL of suspension containing 2000, 3000, or 4000 eggs of *M.*

*javanica* or *M. incognita*, and 45 days later, and the height of the plants, and the number of galls and eggs per root system were evaluated. The experiment was completely randomized and consisted of seven replicates per treatment. In the first experiment, reductions in the number of eggs of 40 and 51% were observed for the nematode levels of 3000 and 4000, respectively, when *R. etli* was applied, and there was no significant difference for the number of galls and plant height. In the second experiment, with *M. javanica* only, at the inoculum levels of 2000 and 4000 eggs, significant reductions of 56% and 41% of the number of eggs, respectively, were observed after the application of *R. etli*. A reduction of 65% in the number of galls was also observed when 2000 eggs were added to the soil. As for *M. incognita*, a significant increase of 29% in the height of the plants was observed when *R. etli* was applied at the inoculum density of 3000 eggs of the nematode per pot. The number of galls was reduced in 63% and 35% when *R. etli* was applied at inoculum densities of 2000 and 4000 eggs/pot, respectively. No significant difference was observed for the number of eggs in neither of the treatments.

**Key-words:** rhizobacteria, root-knot nematode, inoculum density.

## INTRODUÇÃO

Os nematóides das galhas, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood reduzem significativamente a produtividade agrícola quando em altas infestações (Lordello, 1981). A extensa distribuição geográfica e o alto grau de polifagia associado às reduções substanciais na produção agrícola causado por esses nematóides posicionam esse gênero como um dos principais causadores de doenças em plantas (Ferraz *et al.*, 2001).

O controle de nematóides fitoparasitas é bastante complexo. Durante muito tempo realizou-se o controle pela aplicação de nematicidas químicos, porém o alto custo ecológico e econômico desses produtos tem desestimulado a aplicação dos mesmos. A busca de novos métodos visando à substituição dos nematicidas convencionais é hoje uma preocupação de muitos pesquisadores. Uma alternativa que vem sendo bastante estudada é o controle biológico.

Estirpes de bactérias não patogênicas habitantes da rizosfera das plantas apresentam grande potencial na supressão de fitopatógenos. Essas bactérias são designadas rizobactérias ou rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) quando apresentam a capacidade de estimularem o crescimento de plantas (Kloepper *et al.*, 1980; Kloepper *et al.*, 2004). O efeito benéfico das rizobactérias sobre as plantas pode ocorrer de forma direta, através da supressão de patógenos ou indireta envolvendo os seguintes mecanismos: produção de fitohormônios, cujas substâncias promovem o crescimento das plantas, a exemplo de giberelinas (Holl *et al.*, 1988), auxinas (Boronin *et al.*, 1993) e dos ácidos lático e succínico (Yoshikawa, 1993). As PGPR são também capazes de solubilizar minerais presentes no solo. A elevação da disponibilidade de fósforo tem sido atribuída a algumas rizobactérias, ocorrendo aumento do crescimento de plantas por estímulo da absorção desse elemento (Lifshitz *et al.*, 1987). Outro mecanismo de ação destas bactérias é a produção de sideróforos, os quais são compostos de baixo peso molecular queladores de ferro, indisponibilizando este elemento aos fitopatógenos (Catellan, 1999; Neilands, 1981). Além disso, elas podem induzir a resistência sistêmica nas plantas a diversos fitopatógenos. Os mecanismos de ação das rizobactérias envolvidos no controle de fitonematóides abrangem a indução de resistência (Oostendorp & Sikora, 1990; Sikora & Hoffmann-Hergarten, 1992; Hasky-Günther *et al.*, 1998), a inibição da eclosão de ovos através da degradação dos exudatos radiculares (Oostendorp & Sikora, 1990), a produção de substâncias tóxicas ao redor das raízes e, ou, alteração dos exudatos radiculares, causando a perda da atratividade dos nematóides às raízes (Becker *et al.*, 1988). Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de induzir resistência sistêmica em tomateiro contra *M. javanica* (Siddiqui & Shaukat, 2002). A bactéria *Rhizobium etli* G12, anteriormente denominada *Agrobacterium radiobacter*, estirpe G12A, foi isolada da rizosfera de plantas de batata e mostrou-se eficiente em induzir resistência em plantas de batata contra *Globodera pallida* e *M. incognita* (Hasky-Günther *et al.*, 1994; Mahdy *et al.*, 2001). Em outros estudos, *R. etli* suprimiu a penetração de *G. pallida* nas raízes em experimentos em casa-de-vegetação e no campo (Hackenberg & Sikora, 1990; Racke & Sikora, 1992).

Segundo Jatala (1986), alguns atributos são necessários para o sucesso dos organismos biocontroladores. Um dos principais é que o candidato deve suprimir as populações de nematóides, mesmo quando estas se encontram em altas densidades. Siddiqui *et al.* (2002) observaram reduções significativas na multiplicação de *M.*

*javanica* em diferentes densidades populacionais em tomateiro por *P. aureoginosa* IE-6S<sup>+</sup> aplicada em combinação com zinco. Em outro ensaio, Siddiqui *et al.* (1995), estudando o efeito de diferentes níveis de inóculo de *M. incognita*, com a inoculação ou não de *Rhizobium* em ervilha, observaram maiores danos causados pelo nematóide na ausência da bactéria em todos os níveis de inóculo testados com relação ao tratamento testemunha. A validação da efetividade de um agente biocontrolador sobre o patógeno deve ser feita sob diferentes níveis do nematóide antes de se lançar um produto, pois ele pode falhar em condições de campo se a densidade populacional do patógeno for muito alta. Este é um dos motivos da inconsistência de resultados entre estudos de casa-de-vegetação e campo. O isolado *R. etli* utilizado neste estudo teve sua eficiência constatada em casa-de-vegetação na Alemanha, foi trazido ao Brasil e regulamentado de acordo com o processo número MAPA 21028.004176/2004-34 para se avaliar a indução de resistência sistêmica contra população local do nematóide das galhas, *Meloidogyne* spp. em tomateiros. Assim este trabalho objetivou verificar a eficiência *R. etli* no controle de *M. javanica* e *M. incognita* em diferentes níveis de inóculo dos patógenos desafiantes em sistema de raiz bipartida ou não.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Produção de inóculo de *M. javanica* e *M. incognita*.** Os nematóides das galhas, *M. javanica* e *M. incognita*, foram multiplicados em tomateiros mantidos em vasos em casa-de-vegetação, com solo previamente tratado com brometo de metila. Os ovos utilizados nos experimentos foram extraídos das raízes utilizando-se a técnica de Hussey & Barker modificada por Boneti & Ferraz (1981).

**Preparo do inóculo bacteriano.** A cultura de *R. etli* isolado G12 foi repicada com alça de Drigalsky sobre meio B de King (King *et al.*, 1954) em placas de Petri e mantidas a 28°C durante 48h. Após esse período, fez-se a raspagem da cultura bacteriana e preparou-se suspensão aquosa ajustada para DO<sub>540</sub> = 0,5. No primeiro experimento aplicou-se a suspensão bacteriana diretamente ao solo, no segundo, as sementes de tomateiro Santa Cruz ‘Kada’ foram microbiolizadas nas suspensões utilizando-se o

método descrito por Oostendorp & Sikora (1989) modificado para 24 h de imersão em temperatura ambiente no laboratório ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Para o tratamento testemunha, as sementes foram imersas em água destilada no lugar de suspensão bacteriana.

**Ensaio em casa-de-vegetação.** Para o primeiro ensaio, sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram semeadas em sementeira contendo substrato (Plantagro<sup>®</sup>) e cultivadas por 20 dias em casa-de-vegetação. Plântulas de aproximadamente 10 cm de altura, foram transplantadas para vasos com 1 L de substrato constituído de solo e areia na proporção 1:1 (v:v). Após 20 dias, quando as plantas estavam com aproximadamente 25 cm de altura, elas foram retiradas do substrato e preparadas para desenvolver sistema radicular bipartido segundo Olzem (2001). Para tal, as raízes foram eliminadas por meio de uma secção transversal da planta na região do coleto. Uma fenda longitudinal de, aproximadamente 8 cm foi aberta a partir da extremidade inferior do caule, sendo as pontas resultantes inseridas no substrato contidas em vasos geminados. O período de enraizamento foi de 10 dias. Depois, uma metade do sistema radicular da planta foi inoculada com 5 mL de suspensão do indutor de resistência, *R. etli* G12 e a outra com 0, 2.000, 3.000 ou 4.000 ovos do patógeno desafiante, *M. javanica* onde utilizou-se pipeta semi-automática. Para o segundo ensaio, as sementes microbiolizadas foram semeadas em vasos contendo 1,5 L de mistura de solo e areia na proporção 1:1 (v:v). Após 15 dias, as plântulas foram inoculadas, com 0, 2.000, 3.000 ou 4.000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita*. Quarenta e cinco dias depois, avaliaram-se a altura das plantas e o número de galhas e de ovos por sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete repetições por tratamento.

**Análise estatística.** Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa SAS (1989) e as médias comparadas aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio onde se utilizou o sistema de raiz bipartido, o número de ovos foi reduzido por *R. etli* em 41 e 50% nos níveis de inóculo de 3.000 e 4.000 ovos de *M. javanica* (Figura 1). Todavia, não se observou diferença significativa na altura da plantas e nem no número de galhas quando comparado com a testemunha. No segundo ensaio com *Meloidogyne javanica*, com relação à altura de plantas, não houve diferença significativa em nenhum dos níveis de inóculo testados na ausência ou na presença de *R. etli*. Entretanto, nos níveis de inóculo 2.000 e 4.000 ovos/vaso, observou-se redução significativa de 56 e 41%, respectivamente, no número de ovos por sistema radicular com a aplicação de *R. etli* (Figura 2). Redução de 65% também foi observada no número de galhas na densidade de inóculo de 2.000 ovos/vaso (Figura 3).

No ensaio com *M. incognita*, *R. etli* promoveu aumento na altura das plantas de 29% na densidade de inóculo de 3.000 ovos/vaso (Figura 4) e ocasionou reduções do número de galhas em 63 e 35% nas densidades de inóculo 2000 e 4000/vaso, respectivamente (Figura 5), porém, não reduziu significativamente o número de ovos por sistema radicular em nenhum dos tratamentos.

Pressupunha-se que ao elevar os níveis de inóculo dos nematóides, a multiplicação de *M. javanica* e *M. incognita* seria favorecida, e possivelmente, o controle dos nematóides pela bactéria seria dificultado. Entretanto, *R. etli* mostrou-se eficiente em reduzir o número de galhas e de ovos nas densidades mais altas do inóculo (4.000 ovos) de ambos os nematóides. Siddiqui *et al.* (2002) inocularam tomateiro com 1.000, 2.000 e 4.000 J2 de *M. javanica* e aplicaram *P.aeruginosa* IE-6S em combinação com zinco visando o controle do nematóide. Os autores observaram redução no nível de infecção em todos os níveis de inóculo do patógeno. Em outro ensaio, Siddiqui *et al.* (1995) inocularam plantas de ervilha com 500, 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 juvenis de *M. incognita* e a bactéria *Rhizobium*. O número de galhas foi maior nas plantas não bacterizadas do que nas bacterizadas, todavia os autores observaram aumento do número de galhas com o aumento dos níveis de inóculo do nematóide mesmo na presença da bactéria. Em parte esses resultados corroboram os obtidos no presente experimento, no presente, no qual, porém, não foi observado aumento do número de galhas em consequência do aumento dos níveis de inóculo do patógeno na presença da

bactéria, reafirmando a eficiência de *R. etli* sobre os nematóides mesmos quando esses se encontram em altos os níveis populacionais.

No segundo ensaio, no qual foram inoculados 2.000 ovos de nematóides na ausência de *R. etli*, notou-se maior número de galhas em relação aos outros níveis de inóculo (3.000 e 4.000) para ambos os nematóides. Tal fato possivelmente se deve ao grande número de juvenis que penetraram nas raízes, não terem conseguido estabelecer sítios de alimentação em função da competição. O estresse causado pelos altos níveis populacionais dos nematóides provavelmente ocasionou o surgimento de machos, os quais penetram nas raízes, mas não causam a formação de galhas. Segundo Papadopoulou & Triantophyllou (1982), vários estresses podem levar à reversão sexual dos juvenis, e ao surgimento de machos, o aumento da densidade populacional dos nematóides pode acarretar tal efeito, sendo que, o fenômeno ocorre especialmente com os nematóides das galhas. Outro fator a ser considerado é a perda de sítios de alimentação nas raízes decorrente da penetração de um elevado número de J2, ocasionando obstrução do sistema radicular. Schochow *et al.* (2004) inocularam plantas de tomate após cinco semanas de idade com 0, 100, 1.000 e 10.000 ovos de *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica*. Os autores observaram relação inversa entre a densidade de inóculo e a população final de *M. javanica* e *M. incognita*. Ao inocularem as plantas com 10.000 ovos, observaram maiores danos nas raízes e perda da disponibilidade de sítios de alimentação, conseqüentemente menor taxa de multiplicação dos nematóides.

Neste ensaio também não se observou efeito da bactéria quando 3.000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita* foram inoculados, em contraposição com o primeiro ensaio, em que a bactéria *R. etli* foi eficiente em reduzir o número de ovos na densidade de inóculo 3.000. Embora tenha se observado controle de *M. javanica* e *M. incognita* nos diferentes níveis de inóculo, torna-se difícil inferir sobre o potencial antagonístico de *R. etli* para todos os níveis de inóculos testados no presente trabalho, uma vez que não houve consistência dos resultados entre o primeiro experimento e o segundo, com relação a *M. javanica*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, J.O., ZAVALETA-MEJIA, E., COLBERT, S.F., SCHROTH, M.N., WEINHOLD, A.R., HANCOCK, J.G., GUNDY, S.D.V. and VAN-GUNDY, S.D. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, 78: 1466-1469.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6 (Suplemento):553 resumo.
- CATTELAN, A.J. 1999. Métodos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas a bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: EMBRAPA CNPS, 36p.
- FERRAZ, L.C.C.B. G.L. ASMUS; R.G. CARNEIRO; P. MAZAFFERA & J.F.V. SILVA. 2001. Relações Parasito-Hospedeiros nas Meloidoginoses da Soja. Embrapa Soja, Londrina, 127p.
- HACKENBERG, C. & R.A. SIKORA. 1990. Influence of abiotic and biotic factors on the interrelationship between plant health promoting rhizobacteria and *Globodera pallida* on potato. *Nematologica*, 36:355-356.
- HASKY-GÜNTHER, K.; S. HOFMANN-HERGARTEN & R.A. SIKORA. 1998. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundamental and Applied Nematology*, 21:511-517.
- HOLL, F.B.; C.P. CHANWAY; R. TURKINGTON & R.A. RADLEY. 1988. Response of crested wheatgrass (*Agropyron crystatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20:19-24.
- JATALA, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopatology*, 24:253-289.
- KING, E.O.; M.K. WARD & D.E. RANEY. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44:301-307.
- KLOEPPER, J.W.; J. LEONG; M. TEINTZE & M.N. SCHROTH. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286:885-886.
- KLOEPPER, J.W.; M.S REDDY; D.S. KENNEDY; C. VAVRINA; KOKALIS-N. BURELLE & N. MARTINEZ-OCHOA. 2004. Applications of rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticultural*, 631:219-229.

- LIFSHITZ, R.; H. GUILMETTE & M. KOZLOWSKI. 1988. Tn5-mediated cloning of genetic region from *Pseudomonas putida* involved in the stimulation of plant root elongation. *Applied and Environment Microbiology*, 54:3169-3172.
- LORDELLO, L.G. E. 1981. Nematóides das plantas cultivadas. 6ª. Ed. São Paulo, Nobel, 314p.
- MAHDY, M; J. HALLMANN & R.A. SIKORA. 2001. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66(2b):655-662.
- NEILANDS, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annual Review Biochemistry*, 50:715-731.
- OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1989. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. *Revue de Nématologie*, 12(1):77-83
- PAPADOPOULOU, J. & A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Journal of Nematology*, 14:549-566.
- RACKE, J. & R.A. SIKORA. 1992. Wirkung der pflanzengesundheitsfördernden Rhizobakterien *Agrobacterium radiobacter* und *Bacillus sphaericus* auf den *Globodera pallida* – Befall der Kartoffel und das Pflanzenwachstum. *Journal of Phytopathology*, 134:198-208.
- SAS Institute SAS/STAT user's guide, version 6, fourth edition, v. 2. SAS institute Inc., Cary, NC. 1989.
- SCHOCHOW, M; S.A. TJOSVOLD. & A.T. PLOEG. 2004. Host status of *Lisanthus* 'mariach lime green' for three species of root-nematode. *HortScience*, 39(1):120-123.
- SIDDIQUI, I. A.; I. MAHMOOD & M.A. ANSARI. 1995. Effect of diferent inoculum levels of *Meloidogyne incognita* on the growth of pea in the presence ans absence of *Rhizobium*. *Nemtologia Mediterranea*, 23:249-251.
- SIDDIQUI, I. A. & S.S. SHAUKAT. 2002. Rhizobacteria-mediated Induction of Systemic Resistance (ISR) in Tomato against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Phytopathology*, 150:469.
- SIDDIQUI, I. A.; S.S. SHAUKAT & M. HAMID. 2002. Role of zinc in rhizobacteria-mediated suppression of root-infection fungi and root-knot nematode. *Phytopathology*, 150:569-575.

- SIKORA, R.A. 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Med. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, 53(2b):867-878.
- SIKORA, R.A. & S. HOFFMANN-HERGARTEN, 1992. Importance of plant health-promoting rhizobacteria for the control of soil-borne fungal disease and plant parasitic nematodes. Arabien Journal Plant Protection 10(1): 53-48.
- YOSHIKAWA, M. 1993. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. Canadian Journal of Microbiology, 39:1150-1154.

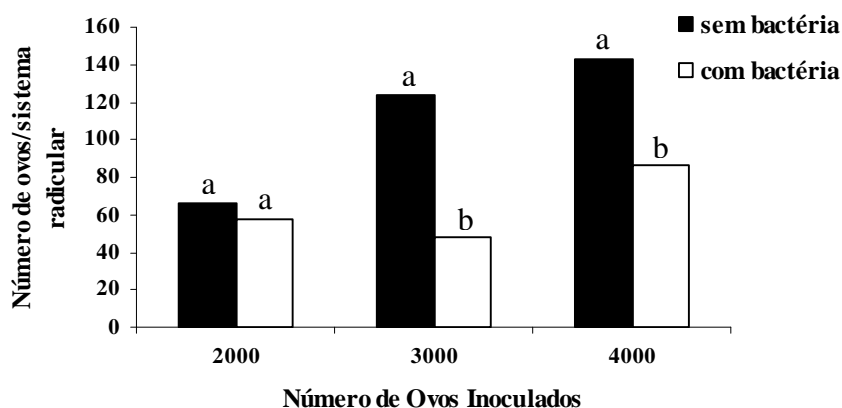


Figura 1 – Número de ovos em sistema radicular bipartido em tomateiros inoculados ou não com *Rhizobium etli* visando o controle *Meloidogyne javanica* em diferentes níveis de inóculo, aos 45 dias da infestação do solo com ovos. Barras comparadas duas a duas, dentro de cada nível de inóculo, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

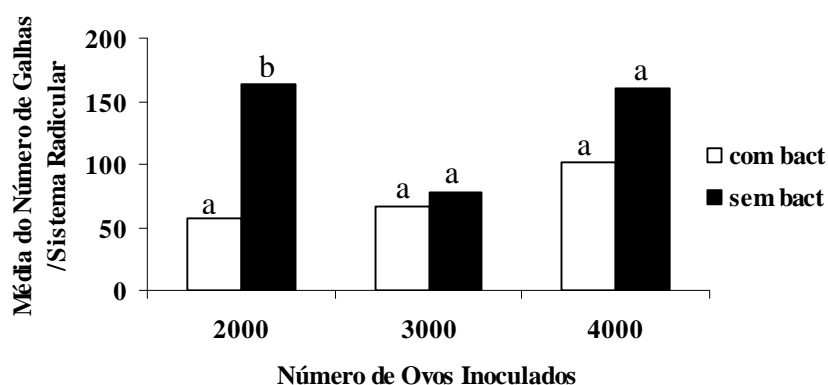


Figura 2 – Número de galhas em raízes de tomateiro inoculadas ou não com *Rhizobium etli* visando o controle *Meloidogyne javanica* em diferentes níveis de inóculo, aos 45 dias da infestação do solo com ovos. Barras comparadas duas a duas, dentro de cada nível de inóculo, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

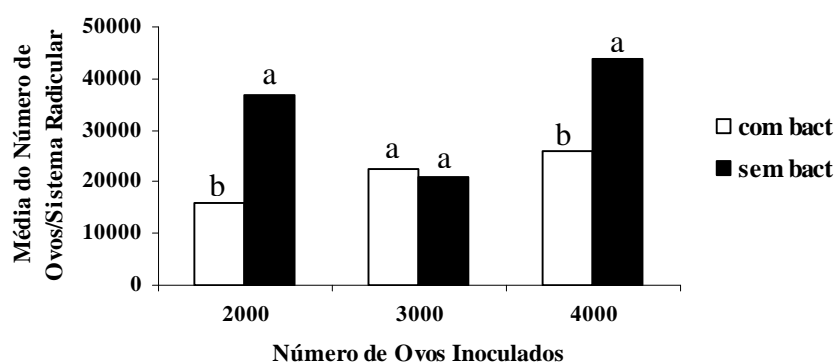


Figura 3 – Número de ovos em raízes de tomateiro inoculadas ou não com *Rhizobium etli* visando o controle *Meloidogyne javanica* em diferentes níveis de inóculo, aos 45 dias da infestação do solo com ovos. Barras comparadas duas a duas, dentro de cada nível de inóculo, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

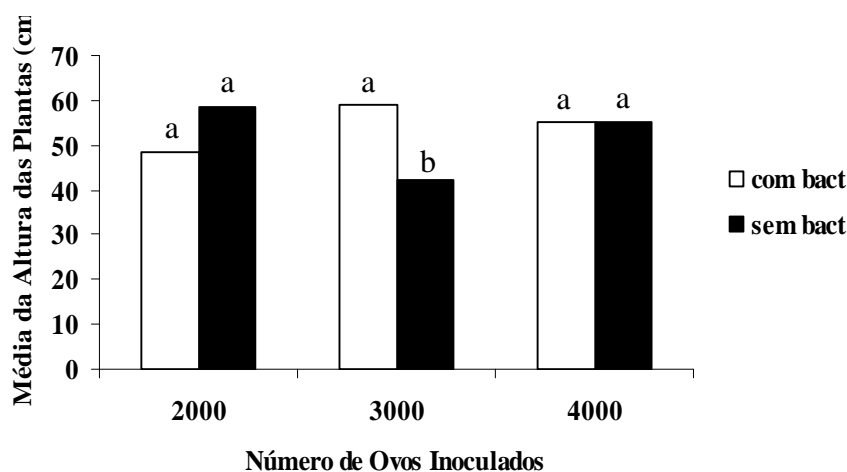


Figura 4 – Altura da parte aérea de tomateiro inoculados ou não com *Rhizobium etli* visando o controle *Meloidogyne incognita* em diferentes níveis de inóculo, aos 45 dias da infestação do solo com ovos. Barras comparadas duas a duas, dentro de cada nível de inóculo, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

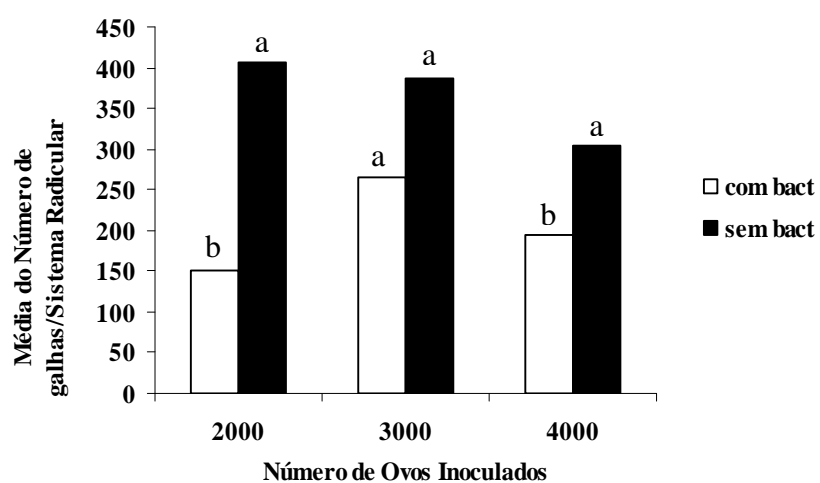


Figura 5 – Número de galhas em raízes de tomateiro inoculadas ou não com *Rhizobium etli* visando o controle *Meloidogyne incognita* em diferentes níveis de inóculo, aos 45 dias da infestação do solo com ovos. Barras comparadas duas a duas, dentro de cada nível de inóculo, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## CAPÍTULO IV

### RESISTÊNCIA INDUZIDA EM TOMATEIRO A *Meloidogyne incognita* E *Meloidogyne javanica* POR RIZOBACTÉRIAS\*

CLÉIA DE FÁTIMA SILVA FABRY<sup>1</sup>, LEANDRO GRASSI DE FREITAS<sup>1</sup>;  
REGINALDO DA SILVA ROMEIRO<sup>1</sup>; MÁRCIO TADEU GODINHO<sup>1</sup>; VANESSA  
SABIONI DE ALMEIDA<sup>1</sup> & SILAMAR FERRAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa MG, Brasil.  
\*Parte da tese de doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Viçosa (Bolsista da  
CAPES)

**Resumo:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; R.S. Romeiro; M.T. Godinho; V.S. Almeida & S. Ferraz. 2006. Resistência induzida em tomateiro a *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* por rizobactérias.

Selecionaram-se, dentre vários isolados de rizobactérias com comprovada atividade antagonística a fungos e bactérias fitopatogênicos, aqueles com potencial para o biocontrole de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* e testaram-se duas formas de veiculação desses isolados. Vinte e sete isolados foram repicados em meio de cultura, incubados e suspensos em água, isoladamente. Sementes de tomateiro foram microbiolizadas e semeadas e transferidas para substrato constituído de solo e areia 1:1 (v:v) em copos de 200 mL. Após 15 dias, o solo de cada copo foi infestado com 2000 ovos de *M. javanica*. Sessenta dias após a infestação, foram avaliadas as alturas da parte aérea das plantas, o número de galhas e de massa de ovos por sistema radicular. O experimento constou de 6 repetições por tratamento. Os três isolados mais efetivos no controle dos nematóides foram submetidos à reavaliação no segundo e no terceiro experimento, utilizando-se copos contendo 300 mL de substrato. Para o segundo experimento o procedimento foi o mesmo do primeiro, porém o solo foi infestado com 2000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita*. No terceiro experimento, aplicou-se 5 mL de suspensão aquosa de cada isolado diretamente ao solo 15 dias após o semeio ao invés de microbiolizar as sementes. Três dias depois, o solo foi infestado

com 2000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita*. Ambos o segundo e o terceiro experimentos foram retirados 45 dias após a introdução dos nematóides no solo e a altura de plantas, número de galhas e de massas de ovos por sistema radicular foram avaliados e os experimentos tiveram delineamento inteiramente ao acaso, com sete repetições por tratamento. Três isolados se destacaram, UFV-36, UFV-0011 e *Pseudomonas putida*, reduzindo número de galhas e de massa de ovos de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* significativamente. Esses isolados foram eficientes em controlar *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* quando aplicados em microbiolização das sementes, mas não controlaram os nematóides quando aplicados na forma de rega da planta com suspensão de células.

**Palavras-chave:** nematóide das galhas, biocontrole indução de resistência.

**Summary:** Fabry, C.F.S.; L.G. Freitas; R.S. Romeiro; M.T. Godinho; V.S. Almeida & S. Ferraz. 2006. Induced resistance in tomato plants against *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* by rhizobacteria.

Various rhizobacteria isolates with proven antagonistic activity toward plant-parasitic fungi and bacteria were compared to select those with potential for the biocontrol of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* and two ways of application of these isolates were evaluated. Twenty seven isolates were transferred culture medium, incubated and suspended in water, individually. Tomato seeds were soaked in bacterial cell suspension and sowed into a substrate composed of soil and sand 1:1 (v:v) in 200 mL plastic cups. After 15 days, the soil of each cup was infested with 2000 eggs of *M. javanica*. Sixty days after the infestation, the plant height, the weight of the above-ground part, and number of galls and egg masses of eggs per root system were evaluated. The experiment consisted of 6 replications per treatment. The three isolates most effectives in the control of the nematodes were subjected to reevaluation in the second and third experiments, using plastic cups with 300 mL of substrate. For the second experiment the procedure was the same used in the first, however the soil was infested with 2000 eggs of *M. javanica* or *M. incognita*. In the third experiment 5 mL of aqueous suspension of each isolated was applied directly to the soil 15 days after the

sow. Three days later, the soil was infested with 2000 eggs of *M. javanica* or *M. incognita*. Both experiments were taken down 45 days after the introduction of the nematodes into the soil, and the height of the plants and the number of galls and egg masses per root system were evaluated. All the experiments were completely randomized, with replications per treatment. Three isolates stood out from the others, UFV-36, UFV-0011 and *Pseudomonas putida*, reducing the number of galls and of egg masses of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* significantly. Those isolates were effective in controlling *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* when applied in seed microbiolization, but not when applied as soil drench in cell suspension.

**Key-words:** root-knot nematode, biocontrol, induced resistance.

## INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas são responsáveis por grandes perdas, sendo o gênero *Meloidogyne* considerado o mais importante, pois ocorre de forma generalizada em muitas áreas agrícolas e parasita quase todas as plantas cultivadas (Sinclair & Backmann, 1993). Métodos alternativos ao uso de nematicidas para o manejo desses nematóides têm sido de grande importância para a sustentabilidade da agricultura, uma vez que o controle químico tem alto custo e é altamente poluente e prejudicial à saúde humana.

Diversos microrganismos de solo são conhecidos como parasitas ou predadores de fitonematóides (Sharma & Vivaldi, 1999), e entre eles as rizobactérias, cujo habitat é a rizosfera, zona do solo influenciada pelos exsudatos radiculares, onde elas se multiplicam e sobrevivem. Esses organismos também têm sido denominados PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) correspondente à sigla em inglês ("Plant Growth-Promoting Rhizobacteria") (Kloepper & Schoroth, 1978). Esse termo é aplicado àquelas bactérias que exercem efeito benéfico às plantas através da promoção de crescimento e do controle biológico de doenças (Kloepper, 1996; Larkin *et al.*, 1996; Raupach *et al.*, 1996).

A indução de resistência sistêmica (ISR) a doenças de plantas é uma das formas de atuação das rizobactérias no controle de fitopatógenos. Normalmente a ISR está associada ao acúmulo das enzimas peroxidases, fenilalaninase, lipoxigenase,  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinases (Koch *et al.*, 1992; Schneider & Ullrich, 1994; van Lonn, 1997) e a síntese de fitoalexinas e outros metabólitos secundários (Van Peer *et al.*, 1991; Zdor & Anderson, 1992). Uma das características da ISR é a não especificidade, ou seja, possui amplo espectro, protegendo a planta contra diversos fitopatógenos. Isso faz da ISR mais vantajosa quando comparada à indução de resistência clássica, na qual o antagonista é normalmente ativo contra um ou poucos patógenos (Wei *et al.*, 1991).

As rizobactérias vêm sendo bastante estudadas, com vários casos de sucesso relatados na literatura. Neipp & Becker (1999) encontraram bactérias que reduziram a infecção do nematóide, *Heterodera schachtii* em beterraba açucareira. Hackenberg & Sikora (1994) observaram que tubérculos de batata tratados com *Agrobacterium radiobacter* (*R. etli*) resultaram na redução da penetração de juvenis de *Globodera pallida* em estudos em casa-de-vegetação, além de ocasionar também a redução da eclosão dos juvenis *in vitro*. Siddiqui *et al.* (2003) relataram supressão de *M. javanica* *in vitro* e em casa-de-vegetação por *Pseudomonas aeruginosa* isolado IE-6S<sup>+</sup>. Teixeira *et al.* (2005) isolaram rizobactérias benéficas a partir de mudas clonais de eucalipto, para as quais comprovou-se a eficiência na promoção do enraizamento, crescimento e biocontrole de fitopatógenos. Um novo produto biológico constituído de rizobactérias, denominado Rizolyptus<sup>®</sup>, vem sendo produzido e testado em escala piloto nas formulações líquida e sólida com o objetivo de reduzir a intensidade de doenças, obter ganhos no enraizamento e promover o crescimento de clones de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2004).

Alguns autores relatam que a forma de aplicação das rizobactérias pode ser um fator importante na multiplicação das bactérias e colonização da rizosfera (Mazzola *et al.*, 1995). De acordo com Kloepper *et al.* (1985), os isolados de rizobactérias com habilidade de utilizar exudatos de sementes possuem a vantagem competitiva na colonização das raízes.

Como as rizobactérias apresentam várias formas de ação sobre os nematóides, não há método específico de seleção de estirpes eficientes *in vitro*, sendo necessário o isolamento e comparação dos isolados em bioensaio visando o controle de fitonematóides. A chance de se encontrar isolados eficientes é baixa, necessitando-se testar grande número deles. Moura (1996) isolou actinomicetos de diferentes solos, de

rizoplano e de tecidos internos de raiz de tomateiro e encontrou isolados que exibiram atividade antagonística quando veiculados as sementes contra *Ralstonia solanacearum*. Silva (2002) em outro ensaio isolou estirpes de actinomicetos e bactérias que foram hábeis em induzir resistência sistêmica contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em condições controladas. Nesse trabalho objetivou-se testar isolados com comprovado antagonismo a outros fitopatógenos, contra *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* em tomateiro sob condições de casa-de-vegetação, avaliando-se também sua eficiência quando aplicados em microbiolização de sementes ou via rega de solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Produção de inóculo de *M. javanica* e *M. incognita*.** Os nematóides das galhas, *M. javanica* e *M. incognita*, foram multiplicados em tomateiros mantidos em vasos em casa-de-vegetação, com solo previamente tratado com brometo de metila. Os ovos utilizados nos experimentos foram extraídos das raízes pela técnica de Hussey & Barker modificada por Boneti & Ferraz (1981).

**Obtenção do inóculo bacteriano.** foram testados 27 isolados bacterianos (UFV-0001, UFV-0002, UFV-0009, UFV-0010, UFV-0011, UFV-0005, UFV-030, UFV-034, UFV-035, UFV-036, UFV-027, UFV-001, UFV-007, UFV-008, UFV-009, UFV-004, UFV-006, UFV-002, UFV-005, UFV-003, B412R, B224R, B256R, B205R, B322R, UFV-75 e *Pseudomonas putida*), obtidos da rizosfera de tomateiro, os quais foram pré-selecionados segundo a capacidade antagonística a outros fitopatógenos (Moura, 1996; Silva, 2002). Os isolados foram emulsificados em glicerina 15% (Gherna, 1994) e mantidos em freezer em temperatura de -80 °C. Para os experimentos repicaram-se os isolados pelo método de estrias em zigue-zague em placas de Petri, contendo o meio 523 de Kado & Heskett (1970). As placas foram mantidas em incubadora durante 24 h a 28 °C. Após esse período, adicionou-se água sobre as colônias bacterianas e procedeu-se a raspagem com alça de Drigalski. As suspensões foram ajustadas a  $DO_{540} = 0,5$ . Posteriormente, sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas nessa suspensão utilizando-se o método descrito por Oostendorp & Sikora (1989) modificado

para 24 h de imersão. Para o tratamento testemunha, as sementes permaneceram em água destilada. Para o ensaio no qual foram aplicadas as rizobactérias ao solo em suspensão e não em microbiolização de semente, os isolados foram crescidos nas mesmas condições citadas anteriormente e as suspensões bacterianas foram preparadas com citadas anteriormente.

**Ensaio em casa-de-vegetação.** Foram montados três ensaios, sendo o primeiro uma seleção massal com 27 isolados pré-selecionados para o controle de outros fitopatógenos e dois ensaios com três isolados de rizobactérias que mostraram alta eficiência na supressão de nematóides na seleção massal, sendo um aplicando as bactérias nas sementes e outro via rega do substrato. No primeiro ensaio, sementes foram microbiolizadas com um dos 27 isolados e semeadas em copos plásticos contendo 200 mL de uma mistura de solo e areia 1:1 (v:v). Após a germinação, realizou-se o desbaste deixando-se apenas uma plântula/copo. Aos 15 dias, o solo foi infestado com 2.000 ovos de *M. javanica*. As plantas foram adubadas semanalmente com macro e micronutrientes (Ouro verde®) na quantidade de 3 g/L de água. Sessenta dias após a infestação, avaliaram-se a altura da parte aérea das plantas e o número de galhas e de massas de ovos por sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento. Os três isolados que se destacaram foram submetidos à reavaliação em copos plásticos com 300 mL de substrato. Para isso, o experimento foi realizado como descrito anteriormente, porém o solo foi infestado separadamente com 2.000 ovos de *M. javanica* e *M. incognita*. Para o terceiro ensaio as sementes foram semeadas no solo sem nenhum tratamento e após 15 dias, 5 mL de suspensão aquosa de cada isolado ajustada para  $OD_{540} = 0,5$  foram adicionados em cada copo. Três dias depois, o solo foi infestado individualmente com 2.000 ovos de *M. javanica* e *M. incognita*. Tanto o segundo quanto o terceiro ensaio seguiu o delineamento casualizado, com sete repetições por tratamento e avaliados após 45 dias da inoculação dos nematóides, analisando-se as mesmas variáveis citadas anteriormente.

**Análise estatística.** Os experimentos foram analisados utilizando-se o programa SAEG (Euclides, 1983) e as médias dos tratamentos comparadas entre-si pelo teste de Scott-Knott e Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio, tendo *M. javanica* como desafiante, dos 27 isolados testados, 20 reduziram significativamente o número de galhas em relação à testemunha. Os isolados UFV-001, B205R, UFV-005, UFV-008; B322R, UFV-0011, UFV-036 e *P. putida* apresentaram reduções superiores a 60%. Os isolados que mais se destacaram foram UFV-036, UFV-0011 e *P. putida* proporcionando reduções de 73, 79 e 79% no número de galhas, respectivamente (Figura 1). Com relação ao número de massa de ovos por sistema radicular, todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha sendo que as maiores reduções foram também observadas para os isolados UFV-036, UFV-0011 e *P. putida*, na grandeza de 75, 81, 80% em comparação com a testemunha (Figura 2). Não foram notadas diferenças significativas para a altura das plantas entre os tratamentos.

No segundo ensaio, UFV-36, UFV-0011 e *P. putida* promoverem reduções no número de galhas em 56, 58, 56% respectivamente, e no número de massas de ovos de *M. javanica* em 58, 53, 42%, respectivamente, sem, no entanto, diferirem entre si (Figuras 3 e 4). Quanto a *M. incognita*, as reduções no número de galhas e o número de massas de ovos foram ocasionadas somente pelo isolado UFV-36 em 36% e 50%, respectivamente, quando comparado com a testemunha (Figuras 5 e 6). Não se observou aumento na altura das plantas em nenhum dos tratamentos. Para o terceiro ensaio, não se observou efeito significativo dos isolados no controle dos nematóides para nenhuma das variáveis analisadas.

Os resultados evidenciaram o potencial dos isolados em reduzir a multiplicação dos nematóides quando aplicados em microbiolização de sementes, em proporções iguais ou superiores aos observados por outros autores, a exemplo de Li *et al.*, (2005) que obtiveram reduções de populações de *M. javanica* nas proporções de 52,4 e 45,5% em plantas de feijão mungo na China por *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus brevis*.

Relatos da literatura citam um baixo percentual das rizobactérias isoladas com efeito contra nematóides. Oostendorp & Sikora (1989) isolaram 290 culturas bacterianas da rizosfera de beterraba açucareira e microbiolizaram as sementes visando ao controle de *Heterodera schachtii*, o nematóide do cisto da beterraba açucareira. Apenas oito dos isolados testados foram eficientes contra o nematóide, sendo que três eram *Pseudomonas fluorescens*. Siddiqui *et al.*, (2001) testaram 33 isolados bacterianos

contra *M. javanica*. Somente dois isolados de *P. aeruginosa* (6,1%) tiveram efeito antagonista ao nematóide. Sikora (1988) e Weller (1988) mencionam que o número de rizobactérias isoladas da rizosfera com potencial para o controle de fitonematóides encontra-se em torno de 9% a 10% da população. No presente estudo, 74% das rizobactérias avaliadas promoveram o controle de *M. javanica*; entretanto, cabe salientar que os isolados testados já haviam sido pré-selecionados para o controle de outros fitopatógenos (Moura, 1996; Silva, 2002). Os isolados UFV-001 e UFV-002, além de induzirem resistência sistêmica a *P. syringae* pv *tomato*, reduziram também a intensidade de doenças causadas pelo patógenos *Alternaria solani*, *Corynespora casiiicola*, *Oidium* sp., *Stemphylium solani* e *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomateiro (Silva, 2002). O modo de ação desses isolados se dá, possivelmente, através de indução sistêmica de resistência, pois apresentaram um amplo espectro de ação. Segundo Steiner & Schönbeck (1995) um dos critérios da indução de resistência sistêmica é a inespecificidade de proteção contra fitopatógenos, ou seja, a ocorrência generalizada contra uma ampla gama de hospedeiro.

Constatou-se também o bom desempenho de *P. putida* em limitar a multiplicação de *M. javanica*. Muitos trabalhos ressaltam o potencial antagonístico do gênero *Pseudomonas* a fitonematóides. A aplicação de *P. aeruginosa* em tomateiro controlou significativamente o complexo de fitopatógenos causadores de podridão de raízes, *Fusarium* sp. e de galhas de *Meloidogyne* sp. (Siddiqui, 2000). Em outro estudo, Hackenberg *et al.* (2000) avaliaram o antagonismo de *Pseudomonas chlororaphis* sobre *Pratylenchus penetrans*, o nematóide das lesões, em morangueiro. Após seis semanas, o número de nematóides nas raízes tratadas foi reduzido em 47 e 42% nos dois experimentos realizados. Espécies desse gênero têm se destacado pela sua habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono e competir com a microflora nativa e pela grande agressividade na colonização da rizosfera (Mazzola *et al.*, 1992). Além disso, existem muitos relatos desse gênero atuando como promotoras de crescimentos de plantas (Luz, 1996)

Os isolados UFV-36 e UFV-0011 foram classificados como actinomicetos através da morfologia das colônias (Silva, 2002). Esse grupo de microrganismos tem despertado interesse para a seleção de agentes de controle biológico devido a sua capacidade de sobrevivência em ambientes adversos e pela possibilidade de produção de centenas de compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos, como antibióticos (Ensign, 1992). Uma classe de lactonas macrocíclicas conhecidas como avermectinas foi isolada a partir da fermentação do micélio do actinomiceto



*Streptomyces avermetilis* (Burg *et al.*, 1979). Essas avermectinas foram altamente eficientes contra *M. incognita* mesmo quando aplicadas em doses baixas, além disso, apresentaram baixa toxicidade a mamíferos (Garabedian & Van Gundy, 1983).

No que se refere à de veiculação dos isolados, o método de microbiolização das sementes mostrou-se mais efetivo do que a inoculação na forma de suspensão bacteriana. Alguns autores afirmam que o método ideal para a introdução de rizobactérias no ambiente rizosférico é através da microbiolização das sementes (Cook & Baker, 1983), uma vez que o processo de germinação libera carboidratos e aminoácidos na forma de exudatos (Lynch, 1978). Dessa forma, as bactérias introduzidas no solo junto às sementes utilizam os exudatos de semente como fonte nutricional e colonizam as raízes assim que elas emergem (Luz, 1993). Outra vantagem da microbiolização é que um maior número de propágulos dos isolados pode ser carregado aderidos às sementes, favorecendo a multiplicação e dando vantagem competitiva aos mesmos em relação a outros microrganismos habitantes da rizosfera. Quando os isolados de rizobactérias foram aplicados ao solo, as raízes das plantas com 15 dias de idade já estavam desenvolvidas e colonizadas por outras bactérias, portanto, os isolados testados não tiveram vantagem competitiva sobre outras populações frequentemente produtoras de substâncias tóxicas ou antibióticas. No presente trabalho pôde-se concluir que a melhor forma de aplicação dos isolados foi a microbiolização de sementes.

Os resultados aqui encontrados reforçam os resultados positivos de outros estudos sobre o controle biológico de fitonematóides por rizobactérias. Sabe-se que isolados de *Pseudomonas* e actinomicetos são aptos a suprimir populações de fitopatógenos através da competição por nutrientes, antibiose, produção de sideróforos, produção de HCN e indução de resistência sistêmica nas plantas (Bakker *et al.*, 1991; Leeman, *et al.*, 1995; Pieterse, *et al.*, 2005). Certamente algum ou alguns desses mecanismos estão envolvidos nas interações estudadas. Caso se deseje determinar com segurança se a indução de resistência sistêmica de na planta ocorre com a aplicação destes isolados, estudos com sistema radicular bipartido devem ser conduzidos.

A utilização de rizobactérias com atividade antagonística a vários patógenos de uma determinada cultura é altamente desejável, pois o valor agregado pode reduzir ainda mais os custos com a utilização de insumos, como defensivos químicos de diferentes grupos, e está altamente inserida na filosofia de manejo sustentável de nematóides, principalmente por ser técnica segura para o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, AC.; R.G. MAFFIA; A.L. FARIA; F.L. NUNES; T.G. ZARPELON; E.M. NASCIMENTO & I. F. NEVES. 2004. Testes do inoculante Rizolyptus<sup>®</sup> (formulado turfoso) sobre o enraizamento, crescimento e biocontrole de doenças do eucalipto. (Relatório Técnico - Científico). 146 p.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6 (suplemento):553 (resumo).
- BURG, R.W.; B.M. MILLER; E.E. BAKER; J. BIRNBAUN; S.A. CURRIE; R. HARTMAN; Y.L. KONG; R.L. MONAGHAN; G. OLSON; I. PUTTER; J.B. TUNAC; H. WALLICK; E.O. STAPLEY; R. OIWA & D. OMURA. 1979. Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. Antimicrobial Agents. Chemotherapy, 15:361-367.
- COOK, R.J. & K.F. BAKER. 1993. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, M.N: The American Phytopathological Society, 523p.
- EUCLYDES, R.F. 1893. Sistema para análise estatística genética: SAEG. Viçosa, MG: UFV, 57p.
- ENSIGAN, J.C. 1992. Introduction to the actinomycetes. In: BALOWS, A.; H.G. TRÜPER; M. DWORKIN; W. HARDER & K.H. SCHLEIFER (Ed.) The prokariotes. New York, Springer-Verlang, 811-815.
- GARABEDIAN, S. & S.D. VAN GUNDY. 1983. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. Journal of Nematology, 15:503-510.
- GHERNA, R.L. 1994. Culture preservation. In: GERHARDT, P.R.G.E. MURRAY; W. A. WOOD & N.R. Krig. (Ed.). Methods for general and molecular bacteriology. Washington, American Society for Microbiology, 278-292.
- HACKENBERG, C. & R.A. SIKORA. 1994. Influence of temperature and soil moisture on the biological control of the potato-cyst nematode *Globodera pallida* using the plant-health-promoting rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter*. Journal of Phytopathology, 142:338-344.
- HACKENBERG, C.; A. MUEHLCHEN; T. FORGE, & T. VRAIN, 2000. *Pseudomonas chlororaphis* strain sm3, bacterial antagonist of *Pratylenchus penetrans*. Journal of Nematology, 32(2):183-189.

- LARKIN, R. P.; D.L. HOPKINS, & F.N. MARTIN. 1996. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathology*, 86:812-819.
- LI, B.; G.L. XIE; A. SOAD & J. COOSEMANS. 2005. Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(6):496-501.
- LUZ, W.C. 1993. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1:33-77.
- LYNCH, J.M. 1978. Microbial interactions around imbibed seeds. *Annual Applied Biology*, 89:165-167.
- KADO, C.I & M.G. HESKETT. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-979.
- KLOEPPER, J.W.; F.M.; SCHER; M. LALIBERTÉ. & I. ZALESCA. 1985. Measuring the spermosphere colonizing capacity of bacterial inoculants. *Canadian Journal of Microbiology*, 31:926-929.
- KLOEPPER, J.W. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience*, 46:406-409.
- KOCH, E.; B.M. MEIER; H.G.; EINBEN & A. SLUSARENKO. 1992. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiology*, 99:571-576.
- MAZZOLA, M.; R.J.COOK; L.S. TOMASHOW; D.M. WELLER & L.S PIERSON. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environment Microbiology*, 58:2616-2624.
- MAZZOLA, M. W.P. STHALMAN & J. E. LEACH. 1995. Application method affects the distribution and efficacy of rhizobacteria suppressive of downy brome (*Bromus Tectorum*). *Soil Biology and Biochemistry*, 27(10):1271-1278.
- MAURHOFER, M.; C. HASE; P. MEUWLY; J.P. METRAUX & G. DEFAGO. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the gacA gene and pyoverdine production. *Phytopathology*. 84: 139-146.
- MOURA, A.B. 1996. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotoras de crescimento de tomateiro. Tese de Doutorado, Viçosa:UFV, 64p.

- NEIPP, P.W., J.O. BECKER. 1999. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris vulgaris* against *Heterodera schachtii*. Journal of Nematology, 31(1):54-61.
- OOSTENDORP, M. & R.A SIKORA, 1989. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. Revue de Nématologie 12:77-83.
- PIETERSE, C.M.J.; J.A.VAN PELT; S.C.M. VAN WESS; J. TON; B.W.M. VERHAGEN; K. LEON-KLOOSTERZIEL; S. HASE; M. DE VOS; V.V. OOSTEN; M. POZO; S. SPOEL; S.V.E.A. KOORNNEEF; A. CHALFUN-JUNIOR; M.L.V. RESENDE & L.L VAN LOON. 2005. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. Revisão Anual de Patologia de Planta, 13:277-295.
- RAUPACH, G. S., L. LIU; J.F. MURPHY; S. TUZUN & J. W. KLOEPPER. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Disease, 80:891-894.
- SCHNEIDER, S. & W.R. ULLRICH. 1994. Diferencial induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. Physiol. Mol. Plant Pathol., 43:57-67.
- SIDDIQUI, I.A. (2000). Effects of cell suspension and cell-free filtrates of *Pseudomonas aeruginosa* in the control of root-rot-knot disease complex of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Acta Agrobotanica, 53:47-55.
- SIDDIQUI, I.A.; S. EHTESHAMUL-HAQUE & S.S. SHAUKAT. 2001. Use of rhizobacteria in the control of root rot-knot disease complex of mungbean. Journal of Phytopathology, 149:337-346.
- SIDDIQUI, I.A.; S.S. SHAUKAT; G.H. KHAN; N.I, ALI. 2003. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S<sup>+</sup> in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. Soil Biology & Biochemistry, 35:1625-1634.
- SILVA, H.S.A. 2002. Rizobactérias como indutoras de resistência a patógenos foliares e como protetoras de crescimento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tese de Doutorado, Viçosa UFV, 78p.
- SIKORA, R.A. 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Med. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, 53(2b):867-878.
- SINCLAIR, J.B. & P.A. BACKMANN. 1993. (ed) Compendium of soybean diseases. 3. ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 106p.

- SHARMA, R.D. & L.J. VIVALDI. 1999. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34:(11), 2065-2069.
- STATSOFT, inc. (2001). Statistica (Data Analysis Software System) version 6, www. Statsof.com.
- STEINER, U. & SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. Pg. 86-110. In: HAMMERSCHMIDT, R. & J. KUC. 1995. Induced resistance to disease in plants, Developments in Plant Pathology, V. 4, Kluwer Academic Pub, Dordrech, 182p.
- TEXEIRA, D.A.; A.C. ALFENAS; R.G. MAFIA; L.A. MAFIA & E.M. FERREIRA. 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Fitopatologia Brasileira, 30(4):350-356.
- van LOON L. C. 1997: Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Europ. J. Plant Pathol., 103: 753-756.
- van PEER, R.; G.J. NIEMANN, & B. SCHIPPERS. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. Phytopathology. 81:728-734.
- WEI, G.; J.W. KLOEPPER, & S.TUZUN. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 81:1508-1512.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26:1508-15012.

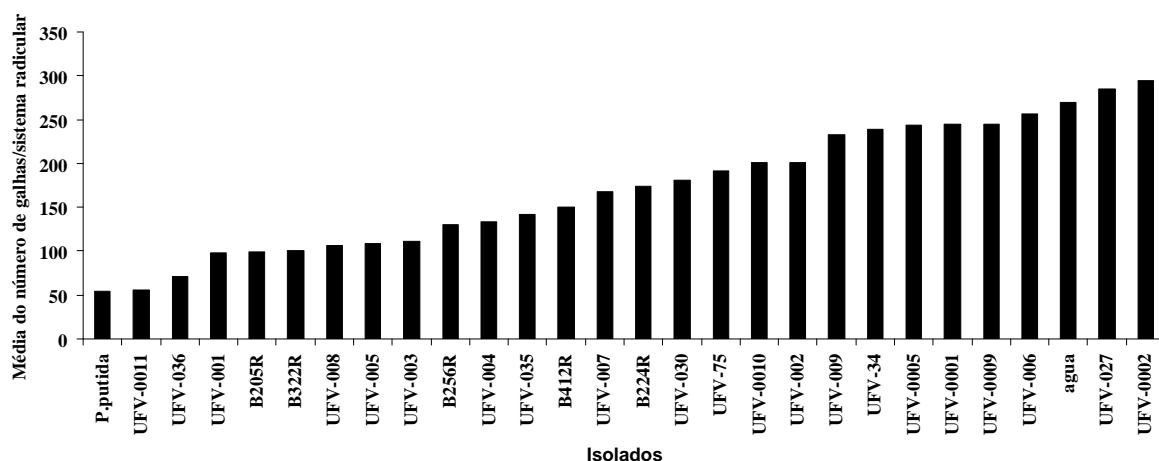


Figura 1 – Média do número de galhas em raízes de tomateiro inoculado com 27 isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos 60 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

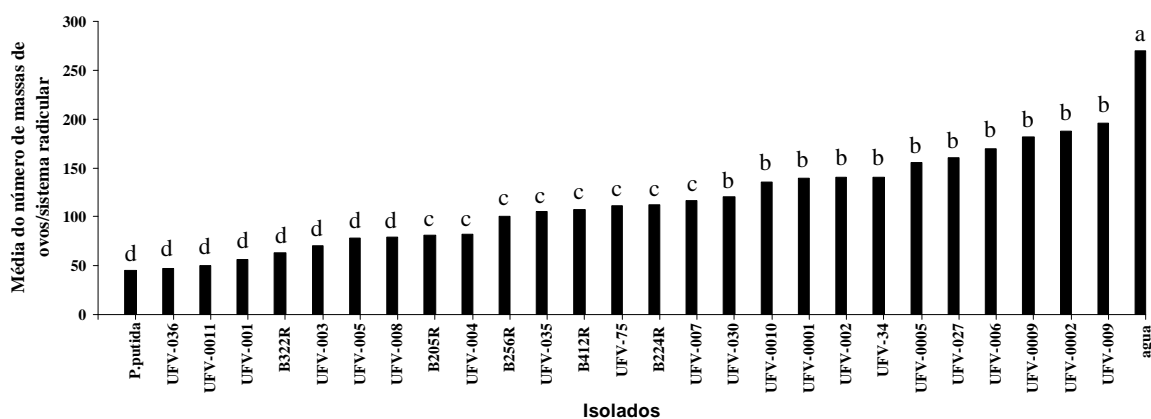


Figura 2 – Número de massa de ovos em raízes de tomateiro inoculado com 27 isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos 60 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

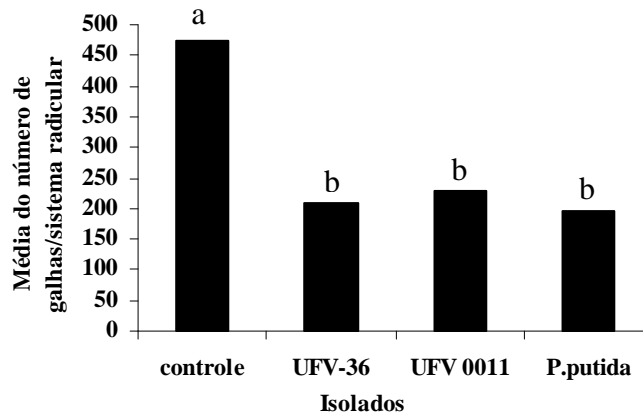


Figura 3 – Número galhas em raízes de tomateiro inoculado com três isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos 45 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

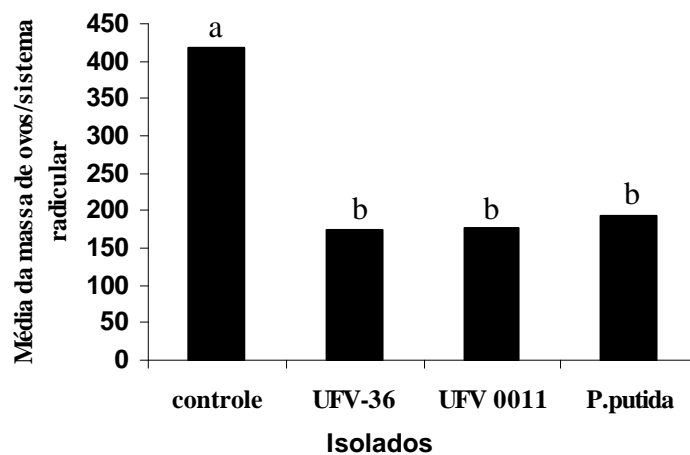


Figura 4 – Número massa de ovos em raízes de tomateiro inoculado com três isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne javanica*, aos 45 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

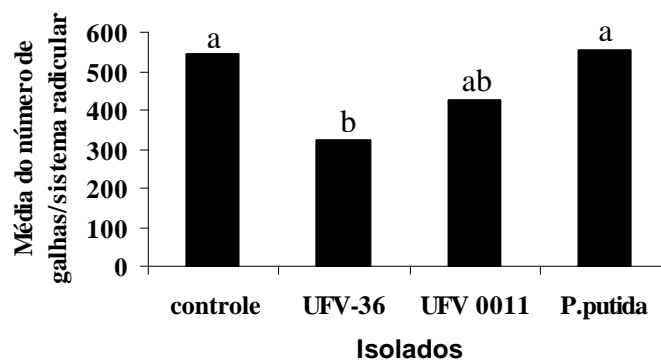


Figura 5 – Número galhas em raízes de tomateiro inoculado com três isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne incognita*, aos 45 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

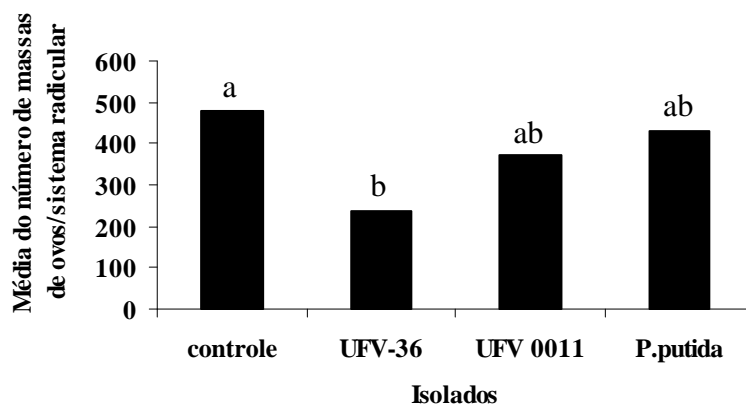


Figura 6 – Número de massa de ovos em raízes de tomateiro inoculado com três isolados bacterianos visando o controle de *Meloidogyne incognita*, aos 45 dias após a infestação do solo com 2000 ovos do patógeno. Barras seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.



## CONCLUSÕES GERAIS

- A rizobactéria *Rhizobium etli* G12 induziu resistência sistêmica a *M. javanica* em tomateiro, mas não promoveu o crescimento das plantas nas condições avaliadas.
- A incorporação de húmus ao solo potencializou o efeito antagonístico de *R. etli* sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* reduzindo o número de galhas por sistema radicular. A utilização de húmus sem a aplicação da rizobactéria não resultou em controle do nematóide.
- *Rhizobium etli* G12 na presença de húmus promoveu o crescimento da plantas, provocando aumento do peso da biomassa verde e da altura das plantas.
- A bactéria *R. etli* é eficiente em reduzir o número de galhas e de ovos de *M. javanica* e *M. incognita* tanto em baixa como em alta concentração de inóculo dos nematóides.
- Rizobactérias para o controle de fungos e bactérias fitopatogênicos foram eficientes em controlar *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* quando aplicados em microbiolização das sementes, mas não controlaram os nematóides quando aplicados na forma de rega da planta com suspensão de células.