

GUILHERME SILVA DE PODESTÁ

**INTERAÇÃO ENTRE *Pochonia chlamydosporia* E  
RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica***

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  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Podestá, Guilherme Silva de, 1983-  
P742i Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no  
2015 controle de *Meloidogyne javanica* / Guilherme Silva de Podestá.  
– Viçosa, MG, 2015.  
viii, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fitonematóides - Controle biológico. 2. Plantas  
antagonistas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 636.96

GUILHERME SILVA DE PODESTÁ

INTERAÇÃO ENTRE *Pochonia chlamydosporia* E  
RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*

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: 20 de fevereiro de 2015.

---

Silamar Ferraz  
(Coorientador)

---

José Rogério de Oliveira

---

Marliane de Cássia Soares da Silva

---

Wânia dos Santos Neves

---

Leandro Grassi de Freitas  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ernani Ornelas de Podestá e Silvana Márcia da Silva Podestá, pela educação, amor incondicional, conselhos e ensinamentos em todos os momentos da minha vida.

À minha querida esposa Tatiane de Souza Vilela, pelo carinho, companheirismo e dedicação durante bons e maus momentos.

Aos meus irmãos Valéria e Otávio, assim como a todos os meus familiares pela confiança e amizade durante esta jornada.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador professor Leandro Grassi de Freitas, pela atenção contínua, amizade, ensinamentos, pelos conselhos e oportunidades, e principalmente pela confiança depositada durante todo este período de convivência.

Ao meu coorientador Silamar Ferraz, pelas críticas, pela colaboração e pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Aos integrantes da banca, José Rogério de Oliveira, Wânia dos Santos Neves e Marliane de Cássia Soares da Silva, pelas críticas e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos professores da UFV, principalmente do Departamento de Fitopatologia pela amizade e contribuição para a minha formação profissional.

Aos colegas do Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia (GEAFIP), pelas experiências e amizade.

Agradeço especialmente aos amigos do laboratório de controle biológico de fitonematoides, Deisy, Érica, Hugo, Leonardo, Thalita, Marilene, Fernanda, Raul, Elder, Paula, Rosana, Augusto, Dayana, José Otávio, Josiane, David, Hayala, Osvaldo, além dos que passaram por lá, pela amizade, pela ajuda e pelo agradável convívio.

## **BIOGRAFIA**

Guilherme Silva de Podestá, filho de Ernani Ornelas de Podestá e Silvana Márcia da Silva Podestá, nasceu em Cabo Verde, Minas Gerais, em 1º de Janeiro de 1983.

Em 2008, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Em Agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado. O qual foi concluído em 2010.

Em 2011, iniciou o Doutorado no mesmo departamento, sob a orientação do professor Leandro Grassi de Freitas.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	
Control of <i>Meloidogyne javanica</i> in Tomato by <i>Pochonia chlamydosporia</i> , <i>Gracilibacillus dipsosauri</i> and Soil Conditioner.....	15
CAPÍTULO 2	
Controle de <i>Meloidogyne javanica</i> em Tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) com Bactérias Endofíticas.....	28
CAPÍTULO 3	
Interação entre <i>Pochonia chlamydosporia</i> e Rizobactérias no Controle de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	45
CAPÍTULO 4	
Meio de Cultura Sólido para a Produção de Bionematicida à Base de <i>Bacillus</i> sp.....	64
CONCLUSÕES GERAIS.....	73

## RESUMO

PODESTÁ, Guilherme Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica***. Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientador: Silamar Ferraz.

Fitonematoides são patógenos de difícil manejo, extremamente importantes para a agricultura mundial. Entre as medidas de manejo utilizadas, o controle biológico tem ganhado espaço, principalmente pela maior conscientização acerca dos malefícios causados pelos nematicidas químicos à saúde humana e ao meio ambiente. No presente trabalho, avaliou-se a compatibilidade entre o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* e isolados bacterianos obtidos em raízes de plantas antagonistas no manejo de *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação, bem como a utilização de substrato sólido para a multiplicação do isolado bacteriano selecionado para o controle de nematoides. Testando o efeito de *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* e de um condicionador de solo organo-mineral no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro, observou-se que na interação dos três tratamentos, e na interação entre *G. dipsosauri* e *P. chlamydosporia*, a redução no número de galhas radiculares causadas pelo nematoide foi de 48 e 41% respectivamente. Os tratamentos com *G. dipsosauri* e *P. chlamydosporia* + Ribumin proporcionaram redução de 26 e 21% no número de ovos respectivamente. A interação entre o fungo nematófago e a rizobactéria foi positiva para o controle do nematoide, apesar do fato de *G. dipsosauri* ter inibido o crescimento do fungo *P. chlamydosporia* em até 30% em teste *in vitro*. Avaliando o controle de *M. javanica* em tomateiro com bactérias endofíticas, observou-se que dos 51 isolados obtidos, 18 foram eficientes em reduzir o número de galhas de *M. javanica*, resultando em 51 a 75% de controle em relação à testemunha. Cinco isolados reduziram o número de massas de ovos de 65 a 75% em relação ao tratamento testemunha. Os tratamentos com os isolados Cs-2, Cs-12 e Mc-3 causaram 22, 24 e 27% de imobilidade nos J<sub>2</sub> de *M. javanica* respectivamente. Os isolados Cs-2, Cp-5 e Mc-3, quando aplicados via irrigação do solo, reduziram em até 46% o número de galhas de *M. javanica*. Além disso, o isolado Mc-3 mostrou-se eficiente também na microbiolização de sementes, reduzindo grandemente a multiplicação do nematoide no interior das raízes. O

fungo *P. chlamydosporia* não produziu compostos antibióticos contra os isolados bacterianos testados e os isolados Cs-2, Cs-12, Cp-1 e Mc-3 foram os que apresentaram maior compatibilidade nos testes de antibiose, efeito dos compostos voláteis e confrontação direta realizados *in vitro*. Quando aplicados via microbiolização de sementes, observou-se que o tratamento com a bactéria Mc-3 proporcionou redução de 23% no número de ovos do nematoide. A combinação da bactéria Cs-2 com Pc-10 proporcionou redução de 31% e a combinação das três bactérias com *P. chlamydosporia* proporcionou redução de 37%. Na aplicação via irrigação, Pc-10 isoladamente reduziu o número de galhas em 33% e quando associado a Mc-3, em 30%. Já quanto ao número de ovos por sistema radicular, as reduções foram de 64, 60 e 49% quando o solo foi tratado com Mc-3, Pc-10 e na interação de ambos, respectivamente. Por fim, nos testes para produção de esporos do isolado Mc-3 (*Bacillus* sp.) em meio sólido, observou-se que a aplicação de 100 mL de água nos sacos contendo 300g de arroz em pré autoclavagem, seguido da aplicação de suspensão bacteriana e incubação por 5 dias a 30°C é eficiente em produzir esporos de Mc-3, gerando em média  $1 \times 10^9$  esporos por grama de arroz. A adição de meios de cultura líquidos à suspensão bacteriana pós autoclavagem não resultou em aumento da produção. Já a aplicação de doses crescentes de farelo de soja ao arroz, mostrou que a aplicação de 10-20 g de farelo de soja por saco, proporciona aumento da produção de esporos de Mc-3.

## ABSTRACT

PODESTÁ, Guilherme Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Interaction between *Pochonia chlamydosporia* and rhizobacteria on the *Meloidogyne javanica* control.** Advisor: Leandro Grassi de Freitas. Co-advisor: Silamar Ferraz.

Plant-parasitic nematodes are unwieldy pathogens, extremely important for global agriculture. Among the management measures used, biological control has gained ground, mainly due to increased awareness of the harm caused by chemical nematicides to human health and the environment. In this study, were evaluated the compatibility between the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) and bacteria isolated from nematode-antagonistic plant roots in the management of *Meloidogyne javanica* in the greenhouse, and the use of solid substrate for multiplication of selected bacterial isolate for the control of nematodes. Testing the effect of *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and an organo-mineral soil conditioner in the control of *Meloidogyne javanica* in tomato plants, it was observed that the interaction of the three treatments, and the interaction between *G. dipsosauri* and *P. chlamydosporia*, reduction the number of root galls caused by the nematode was 48 and 41%, respectively. Treatments with *G. dipsosauri* and *P. chlamydosporia* + soil conditioner resulted in the reduction of 26 and 21% of the number of eggs, respectively. The interaction between the nematophagous fungi and rhizobacteria was positive for controlling nematode, despite the fact that *G. dipsosauri* inhibited the growth of the fungus *P. chlamydosporia* by 30% *in vitro* test. Evaluating the control of *M. javanica* in tomato with endophytic bacteria, it was observed that from the 51 isolates obtained, 18 were effective in reducing the number of galls caused by *M. javanica*, resulting in 51-75% control when compared to the control treatment. Five isolates reduced the number of egg masses from 65 to 75% when compared to the control treatment. The treatments with the isolates Cs-2, Cs-12 and Mc-3 caused 22, 24 and 27% in immobility J2 of *M. javanica* respectively. The isolates Cs-2, Cp-5 and Mc-3, when applied via irrigation of the soil, reduced the number of galls of *M. javanica* by 46%. Furthermore, the isolate Mc-3 was also efficient when used through seed treatment, greatly reducing nematode multiplication in the roots. The fungus *P. chlamydosporia* did not produce antibiotic compounds against

the bacterial isolates, and Cs-2, Cs-12, Cp-1 and Mc-3 isolates had the highest compatibility with the fungus in antibiosis, effect of volatile compounds and direct confrontation tests, performed in vitro. When applied to seeds, it was observed that treatment with Mc-3 bacterium gave 23% of reduction in the number of nematode eggs. The combination of Cs-2 bacteria and Pc-10 gave a reduction of 31%, and combining the three bacteria with *P. chlamydosporia* gave 37% reduction. When the antagonists were applied through soil irrigation, the number of galls caused by *M. javanica* was reduced by 33 and 30% for Pc-10 alone and in combination with Mc-3, respectively. As for the number of eggs per root system, the reductions were 64, 60 and 49% when the soil was treated with Mc-3, Pc-10 and the interaction of both, respectively. Finally, in tests for the production of the Mc-3 (*Bacillus* sp.) spores in solid state fermentation, we observed that the application of 100 ml of water in bags containing 300g of pre-autoclaved rice, followed by the application of bacterial solution and incubated for 5 days at 30°C is effective in producing Mc-3 spores, generating an average of  $1 \times 10^9$  spores per gram of rice. The addition of liquid culture media after autoclaving the bacterial solution did not result in increased production. The application of increasing doses of soybean meal into the rice showed that the application of 10-20 g of soybean meal provides increases in the production of Mc-3 spores.

## INTRODUÇÃO

Os fitonematoides estão entre os principais patógenos de plantas, atacam praticamente todas as culturas de interesse agrônômico e podem causar desde redução da produtividade até a perda total da produção, dependendo da espécie de nematoide, sua densidade populacional, cultivar plantada, clima e tipo de solo (Freitas *et al.*, 2012). Estima-se que mundialmente, as perdas causadas por estes patógenos sejam superiores a 150 bilhões de dólares ao ano (Abad *et al.*, 2008). O gênero *Meloidogyne* spp, é considerado o mais importante, pois além de apresentar grande diversidade de hospedeiros, onde causa enormes perdas, está amplamente disseminado nas mais variadas regiões do mundo (Taylor & Sasser, 1983; Moura, 1996). Estes patógenos podem inviabilizar a produção de diversas culturas como tomate, alface, algodão, café, cana-de-açúcar, cenoura, soja, batata, entre outras (Lordello, 1982).

O sintoma típico da doença causada por esse patógeno é a formação de galhas ou engrossamentos nas raízes, que são resultantes da hipertrofia e hiperplasia das células ao redor da região anterior da fêmea. Estas células modificadas funcionam como um dreno de nutrientes da planta, além de causar deformação em órgãos subterrâneos comestíveis, depreciando seu valor comercial (Ferreira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012). Na parte aérea, como reflexo dos danos causados no sistema radicular, as plantas apresentam tamanho reduzido, sintomas de deficiência nutricional, murcha nas horas mais quentes do dia, definhamento em plantas perenes, podendo chegar à morte (Tihohod, 1993; Ferreira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012).

A principal medida de manejo de fitonematoides é a exclusão, pois uma vez presente na área, sua erradicação é praticamente impossível e as práticas de controle aplicadas irão visar à redução da população. Quando a área já está infestada, podem ser aplicadas diversas medidas de manejo, como utilização de cultivares resistentes, rotação de culturas, pousio, revolvimento e solarização do solo, adição de matéria orgânica, biofumigação, cultivo de plantas antagonistas,

controle químico, controle biológico, entre outras (Ferraz *et al.*, 2010). Sendo que a combinação destes métodos num sistema de manejo integrado, tende a ser mais efetivo e sustentável que a utilização de somente uma estratégia de controle.

A população, antes favorável ao controle rápido e barato de patógenos e insetos por produtos químicos, agora está com nova mentalidade, impondo sérias restrições ao seu uso (Cook & Baker, 1983). Tanto que várias marcas de nematicidas já foram retiradas do mercado por sua alta toxicidade. O controle químico apresenta uma série de problemas ambientais, como contaminação de alimentos e do lençol freático, problemas de saúde em seres humanos e animais, eliminação de organismos benéficos do solo, além de nem sempre serem eficazes e não fornecerem supressão das doenças em longo prazo (Jatala, 1986; Whitehead, 1997; Kerry, 2001). Com isso, a utilização do controle biológico juntamente com outras táticas de manejo, vem aumentando em proporção e já é realidade em diversos locais e sistemas de cultivo (Ferraz *et al.*, 2010).

Sabe-se que em ecossistemas preservados, as epidemias de doenças são raras e a supressão do patógeno é usual. Isso ocorre pelo balanço biológico natural, onde os organismos estão em equilíbrio. A partir do momento em que o homem interferiu neste equilíbrio, criando o monocultivo, cultivos sucessivos, aplicação de grandes quantidades de insumos, entre outros, as epidemias de doenças surgiram. Nesses ambientes, a utilização do controle biológico induzido, ou seja, aplicando organismos antagonistas ou estimulando sua atividade no solo, é a tentativa de se reestabelecer o balanço biológico na área e reduzir as perdas causadas por pragas e patógenos (Cook & Backer, 1983; Stirling, 1991).

Nos últimos 30 anos, o controle biológico de fitonematoides tem ganhado força, com o aumento da conscientização quanto aos malefícios à saúde e ao ambiente, causados pelos nematicidas e com diversos relatos de supressividade do solo por microrganismos. São conhecidos mais de 200 organismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides, entre eles estão fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros e outros (Stirling, 1991; Kerry, 1990; Freitas *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2010). Entretanto, poucos deles possuem

potencial para serem utilizados como produtos para o controle de fitonematoides (Freitas *et al.*, 2009). Tanto que nos diversos produtos disponíveis no mercado, poucas espécies se repetem como organismos antagonistas. Eles atuam sobre populações de nematoides através de mecanismos como predação, parasitismo, competição, antibiose, além de modificar exudatos radiculares e ativar respostas de defesa da planta (Oostendorp & Sikora, 1990; Stirling, 1991; Ferraz *et al.*, 2010).

Algumas características são importantes para que um organismo seja considerado um bom agente de controle biológico. Ser eficiente em reduzir populações do patógeno, ser de fácil manipulação em laboratório, não ser patogênico a seres humanos e animais, sobreviver no solo em condições adversas, ser fácil de produzir em massa, de fácil aplicação com equipamentos convencionais, ser compatível com fertilizantes, defensivos químicos e outras práticas culturais, entre outras (Kerry, 1989; Stirling, 1991; Freitas *et al.*, 2009; Ferraz *et al.* 2010). Dentre os agentes de controle biológico de fitonematoides conhecidos, destacam-se alguns fungos e bactérias, por aliarem maior número de características desejáveis (Stirling, 1991; Freitas *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2010).

Um fungo que vem se destacando pelo potencial de controle sobre fitonematoides é *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard). Foi relatado parasitando ovos de nematoides pela primeira vez, por Willcox & Tribe (1974), atuando sobre ovos de *Heterodera schachtii* e posteriormente, de *Heterodera avenae* Kerry (1975), a ponto de causar supressão desses dois fitonematoides no campo em condições naturais. Atualmente, é considerado um dos mais promissores agentes de controle biológico de fitonematoides (Kerry & Bourne, 1996; Lopes *et al.*, 2007; Freitas *et al.* 2009; Manzanilla-Lopez *et al.*, 2013). Em campos de produção de hortaliças na Espanha, a ocorrência natural de *P. chlamydosporia* isoladamente ou com outro fungo, proporciona aumento no percentual de parasitismo de ovos de nematoides, sugerindo que este seja o principal antagonista atuando nestas áreas (Guiné *et al.*, 2013).

*Pochonia chlamydosporia* possui muitas características desejáveis, relacionadas ao controle biológico. Em vista de sua atividade saprofítica, o fungo pode sobreviver no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 2001; Stirling, 1991). Além disso, é capaz de colonizar a superfície das raízes de muitas espécies de plantas, sendo capaz de eliminar grande quantidade de ovos produzidos pelos nematoides das galhas (Stirling, 1991). Após a hifa penetrar no ovo, ocorre a dissolução enzimática das camadas de quitina e de lipídeos (Morgan-Jones *et al.*, 1983). Além do efeito direto do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre o embrião, o efeito enzimático sobre a casca do ovo aumenta sua permeabilidade e facilita a passagem de possíveis toxinas produzidas pelo fungo no ambiente, pois os juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) não eclodem na presença do fungo (Stirling, 1991).

Sua efetividade no controle de *Meloidogyne* spp. já foi comprovada em vários estudos (De Leij & Kerry, 1991; Campos & Campos, 1997; Lopes *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2009; Podestá *et al.* 2009). Em campo de produção de hortaliças, a aplicação de *P. chlamydosporia* em sementeiras de pepino, proporcionou redução da infecção e multiplicação de *M. javanica* em mais de 40% (Viggiano *et al.*, 2014). Ao estudar o potencial de vários fungos nematófagos para o controle de *M. javanica* em tomateiro, Lopes *et al.* (2007), observaram que dois isolados de *P. chlamydosporia* reduziam o número de ovos em mais de 75%.

Outra característica importante é a produção de clamidósporos, estruturas que possibilitam sua sobrevivência sob condições adversas. Esse fungo também possui a capacidade de colonizar raízes endofiticamente, e atua como promotor de crescimento das plantas, disponibilizando nutrientes antes inacessíveis (Lopez-Llorca *et al.*, 2002; Monfort *et al.*, 2005; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2006; Ebadi *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009; Marciá-Vicente *et al.*, 2009). Em tomateiro, a aplicação de 5.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* por grama de solo, proporcionou aumento no conteúdo dos macronutrientes, Nitrogênio em 14,3%, Fósforo em 24,5% e Potássio em 13,3%, quando comparados ao tratamento sem o fungo (Monteiro, 2014). Além disso, este organismo pode atuar na indução de

resistência sistêmica nas plantas. Na presença de *P. chlamydosporia*, tanto em plantas infectadas por *M. javanica* como sadias, ocorre a superexpressão de enzimas como polifenoloxidase e peroxidase (Medeiros, 2014). O sequenciamento e análise do genoma mostraram que *P. chlamydosporia* é próximo evolutivamente de outros fungos endofíticos. Além disso, ampla gama de enzimas hidrolíticas e transportadoras encontradas no genoma suportam as observações de comportamento multitrófico de *P. chlamydosporia* (Larriba *et al.*, 2014)

Entre as bactérias, destacam-se como agentes de controle biológico as rizobactérias, espécies que colonizam a rizosfera e rizoplane das plantas. Estas atuam sobre populações de nematoides de diferentes formas: produzindo compostos tóxicos, modificando exudatos radiculares, interferindo no reconhecimento da planta pelo nematoide, induzindo resistência sistêmica nas plantas, além de atuarem como promotoras de crescimento (PGPR). (Oostendorp & Sikora, 1990; Freitas *et al.*, 2005; Fabri, 2006; Ferraz *et al.*, 2010).

A indução de resistência sistêmica em plantas de tomate infectadas por *M. javanica*, mediada pela bactéria *Rhizobium etli* foi observada por Fabri (2006), através de experimento com raiz bipartida. Radwan *et al.* (2012), testando alguns bioprodutos de origem microbiana, para o controle de *M. incognita* em tomate, verificaram que o produto Bioarc a base de *Bacillus megaterium*, aplicado na dose de 10g/kg de solo, reduziu em 89% o número de galhas causadas pelo nematoide. Diversas bactérias endofíticas reduziram a multiplicação de *M. incognita* em tomate em aproximadamente 50% em relação à testemunha não tratada. Entre elas, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus pumilus*, *B. sphaericus* (Pinho *et al.*, 2009).

Algumas bactérias são chamadas de endofíticas, por habitarem o interior dos tecidos, sem causar dano à planta, ficando menos expostas em ambiente menos competitivo (Hallmann *et al.*, 1998). Várias espécies de bactérias endofíticas já foram observadas causando redução da infecção por fitonematoides (Siddiqui & Shaukat, 2003; Pinho *et al.*, 2009; Munif *et al.*, 2013). O sistema radicular destas plantas é, portanto, um interessante local para a busca de antagonistas.

Sabe-se que em solos supressivos, mesmo na presença da planta suscetível, do patógeno virulento e ambiente favorável à ocorrência de doença, a população do patógeno é mantida em níveis onde não causam danos econômicos. Isso ocorre pelo balanço biológico na área, onde a presença de matéria orgânica e de vários antagonistas são os principais fatores para a ocorrência deste fenômeno (Cook & Backer, 1983; Stirling, 1991). Desta forma, a introdução de várias espécies antagonistas aos fitonematoides, com diferentes mecanismos de ação contra estes patógenos pode ser uma alternativa para se aumentar a eficiência do controle biológico (Dubbe & Smart Jr, 1987; Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2000; Siddiqui & Shakaut, 2003; Siddiqui & Akhtar, 2009).

Neste contexto, A interação entre fungos parasitas de ovos e fêmeas e rizobactérias, pode ser eficiente no manejo de fitonematoides, pois possuem diferentes mecanismos de ação. A aplicação conjunta de *P. chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco foi mais eficiente no controle de *M. javanica* em plantas de tomate que a aplicação dos tratamentos isoladamente (Dalemolle-Giaretta *et al.*, 2010). A combinação de *Bacillus cereus* e *P. chlamydosporia*, além de aumentar a eficiência do controle do nematoide das galhas, incrementa o efeito de promoção de crescimento apresentado pelos organismos antagonistas.

Segundo Siddiqui & Ehteshamul-Haque, (2000) a aplicação de *P. chlamydosporia*, em conjunto com *Pseudomonas aeruginosa*, resulta em maior taxa de controle de *M. javanica*, que a aplicação dos antagonistas isoladamente. Resultados semelhantes ocorrem quando se combinam *Pochonia chlamydosporia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma viridae* para o controle de *Globodera* spp. em batata (Muthulakshmi *et al.*, 2012). Entretanto, a aplicação de mistura de antagonistas pode não resultar em controle, como observado por Roberts *et al.*, (2005), onde não se obteve redução na infecção causada por *M. incognita* em melão. Cada mistura tem características próprias, a efetividade e o aumento da eficiência de controle com a mistura de antagonistas irá depender de uma série de fatores, como compatibilidade dos organismos envolvidos, os mecanismos de ação contra o nematoide alvo, tipo de material orgânico presente no solo,

capacidade de colonizar e se desenvolver na rizosfera da planta em questão, entre outros.

Após a escolha dos agentes de controle biológico com maior potencial para serem utilizados à campo, é importante desenvolver um meio de cultura eficiente e barato para a multiplicação destes organismos. As metodologias utilizadas para a multiplicação de microrganismos são fermentação em substrato líquido e fermentação em substrato sólido. O processo de fermentação sólida tem sido utilizado há muito tempo em países da Ásia, principalmente na indústria alimentícia, como na produção de bebidas alcoólicas, de enzimas, e alimentos, quase sempre com o arroz como substrato (Holker & Lenz, 2005). Nos países ocidentais, o desenvolvimento da fermentação líquida foi mais expressivo, principalmente a partir de 1940, pela necessidade de produção de antibióticos em larga escala (Holker & Lenz, 2005).

É crescente a utilização da fermentação em substrato sólido nas indústrias biotecnológicas, principalmente na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, alimentos, combustíveis, produtos farmacêuticos, agrícolas, entre outros (Singhania *et al.*, 2009). Esta metodologia apresenta algumas desvantagens, como complicado processo de purificação, dificuldade na determinação da biomassa, baixa automação do processo e a falta de reprodutibilidade dos resultados. Isto ocorre porque o processo é influenciado por fatores como temperatura, umidade, aeração, teor nutricional do substrato, principalmente no cultivo estático, quando o material não é revolvido. Como vantagens, podemos citar alta produção, aumento da estabilidade dos produtos, baixos custos de produção, baixo gasto de água e menor taxa de contaminação. (Holker & Lenz, 2005). Na literatura, encontram-se diversos trabalhos testando substratos sólidos para a produção de *Bacillus* spp. (Capalbo *et al.*, 2001; El-Bendary, 2006; Silva, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Shojaaddini *et al.*, 2010; Marzban, 2012).

Neste contexto, os objetivos do trabalho foram: determinar se existe compatibilidade entre *Pochonia chlamydosporia* e alguns isolados rizobacterianos,

previamente selecionados por seu potencial contra os nematoides das galhas; o seu efeito combinado no manejo destes patógenos em casa de vegetação; avaliar a produção massal dos agentes bacterianos selecionados de *Bacillus* sp. em meio de cultura sólido.

### Referências:

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C.; *et al.* 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Natural Biotechnology*, 26: 909-915.

CAMPOS, H.D. & CAMPOS, V.P. 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 361-365.

CAPALBO, D.M.F.; VALICENTE, F.H. MORAES, I.O. & PELIZER, L.H. 2001. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4: 112-115.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul. APS. 539 p.

DALLEMOLE-GIARETTA, R., FREITAS, L.G.; ZOOCA, R.J.F.; PODESTÁ, G.S.; CAIXETA, L.B.; FERRAZ, S. & LOPES, E.A. 2010. Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 34: 18-22.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. & FABRY, C.F.S. 2006. *Pochonia chlamydosporia* como promotor de crescimento de plântulas de tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIX, Salvador. Resumos, p.191.

DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie*, 14: 157-164.

DUBE, B. & SMART JR, G.C. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 19: 222-227.

EBADI, M.; FATERNI, S. & RIAHI, H. 2009. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. *Biocontrol Science and Technology*, 19: 689-700.

EL-BENDARY, M.A. 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 158-170.

FABRI, C.F.S. 2006. Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias. 63p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Editora UFV, Viçosa. 304 p.

FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S. & FREITAS, L.G. 2012. Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, p. 203-222.

FREITAS, L.G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; PODESTÁ, G.S. & FERRAZ, S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. In: ZAMBOLIM, L. & PICANÇO, M.C. (ed). Controle biológico de pragas e doenças exemplos práticos. Editora UFV, Viçosa, p.41-82.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; FABRY, C.F.S.; MARRA, B.M.; COUTINHO, M.M.; ROMEIRO, R.S. & FERRAZ, S. 2005. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 29: 215-220.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2012. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128.

GUINÉ, A.; BONMATÍ, M.; SARRO, A.; STCHIEGEL, A.; VALERO, J.; ORNAT, C.; FERNÁNDEZ, C. & SORRIBAS, F.J. 2013. Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *Biological Control*, 58: 407-416.

HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN A.; RODRIGUEZ-KÁBANA R. & KLOEPPER J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 925-937.

HÖLKER, U. & LENZ, J. 2005. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301-306.

JATALA, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 453-489.

KERRY, B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. *EPPO Bulletin*, 5: 353-361.

KERRY, B.R. 1989. Fungi as biological agents for plant parasitic nematodes. In: WIPPS, J.M. & LUMSDEN, R.D. (ed). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge: Cambridge University Press, p.153-170.

KERRY, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 22: 621-631.

KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C. & MAGAN, N. (ed). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, 380 p.

KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes – a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47: 69-75.

LARRIBA, E.; JAIME, M.D.L.A.; CARBONELL-CABALLERO, J.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; NISLOW, C.; MARTÍN-NIETO, J. & LOPEZ-LLORCA, L.V. 2014.

Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. Fungal Genetics and Biology, 65: 69-80.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, O.D.; GARDIANO, C.G. & CARVALHO, S.L. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, 31: 78-84.

LOPEZ-LLORCA, L.V.; BORDALLO, J.J.; SALINAS, J.; MONFORT, E. & LÓPEZ-SERNA, M.L. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonization of barley rhizosphere by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium*. Micron, 33: 61-67.

LORDELLO, L.G.E. 1982. Nematoides das plantas cultivadas. 7 ed. Nobel, São Paulo, 314p.

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M.M.; HIRSCH, P.R.; WARD, E.; DEVONSHIRE, J. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. Journal of Nematology, 45: 1-7.

MARCIÁ-VICENTE, J.G.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; JANSON, H.B. & LOPEZ-LLORCA, L.V. 2009. Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. Annals of Applied Biology, 155: 391-401.

MARZBAN, R. 2012. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biopesticide, 5: 144-147.

MEDEIROS, H.A. 2014. Indução de resistência em tomateiro à *Meloidogyne javanica* por *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma atroviride*. 84p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J.O. & SIVASITHAMPARAM, K. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on

*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 1229-1235.

MONTEIRO, T.A. 2014. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. 63p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F. & RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13: 245-260.

MOURA, R.M. 1996. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 209-244.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. 2013. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. *J. ISSAAS*, 2: 68-74.

MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S. & ANITA, B. 2012. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. *Journal of Biopesticide*, 5: 243-245.

OOSTENDORP, M. & SIKORA, R. 1990. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Revue de Nematologie*, 13: 269-274.

PINHO, R.S.C.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M.; SILVA, J.R.C.; OLIVEIRA, M.S.; PIMENTEL, G.C.S.; COSTA, L.S.A.S. 2009. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 33: 54-60.

PODESTÁ, G.S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. & ZOOCA, R.J.F. 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 33: 191-193.

RADWAN, M.A.; FARRAG, S.A.A.; ABU-ELAMAYEM, M.M. & AHMED, N.S. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56: 58-62.

ROBERTS, D.P.; LOHRKE, S.M.; MEYER, S.L.F.; BUYER, J.S.; BOWERS, J.H.; BAKER, C.J.; LI, W.; SOUZA, J.T.; LEWIS, J.A. & CHUNG, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection*, 24:141-155.

SHOJAADDINI, M.; MOHARRAMIPOUR, S. KHODABANDEH, M. & TALEBI, A.A. 2010. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. *Journal of Plant Protection Research*, 50: 9-14.

SIDDIQUI, Z.A. & AKHTAR, M.S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Pathology*, 38: 22-28.

SIDDIQUI, I.A. & EHTESHAMUL-HAQUE, S. 2000. Effect of *Verticillium chlamydosporium* and *Pseudomonas aeruginosa* in the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematologia Mediterranea*, 28: 193-196.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal Phytopathology*, 151: 215-222.

SILVA, M. 2007. Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. 129p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R. & PANDEY, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant-parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, U.K: CAB International. 282 p.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. (Especies de *Meloidogyne*). Artes gráficas de la Universidad del Estado del Carolina del Norte. Raleigh, Carolina del Norte, 111 p.

TIHOHOD, D. 1993. Nematología agrícola aplicada. Jaboticabal, SP: Funep. 372 p.

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G. & LOPES, E.A. 2014. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. Biological Control, 69: 72–77.

WHITEHEAD, A.G. 1997. Plant nematode control. Wallingford: CAB International. 384 p.

WILLCOX, J. & TRIBE, H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. Transactions of the British Mycological Society, 62: 585-594.

ZHAO, S.; HU, N.; HUANG, J.; LIANG, Y. & ZHAO. B. 2008. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. Biotechnology Letter, 30: 295-297.

## Control of *Meloidogyne javanica* in Tomato by *Pochonia chlamydosporia*, *Gracilibacillus dipsosauri* and Soil Conditioner

Guilherme Silva de Podestá<sup>1</sup>, Leandro Grassi de Freitas, Rosangela Dallemole-Giaretta, Ronaldo João Falcão Zooca, Larissa de Brito Caixeta & Silamar Ferraz.

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

Autor para correspondência: [guilherme.podesta@ufv.br](mailto:guilherme.podesta@ufv.br)

**Publicado - Revista Summa Phytopathologica**

**Summary** - Organic matter has a fundamental role in the antagonistic activity of microorganisms over nematode populations in the soil. In this work, the compatibility of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc-12) and the rhizobacteria *Gracilibacillus dipsosauri* (MIC 14) was evaluated *in vitro*, as well as the effect of the fungus to the concentration of 5.000 chlamydo-spores per gram of soil, rhizobacteria at  $4.65 \times 10^9$  cells/g of soil, and the soil conditioner Ribumin® at 10 g/pot doses. The effect of the organisms and soil conditioner was tested, either alone or at any possible combination on *Meloidogyne javanica* population in tomato plants (3.000 eggs/pot). A suspension of water or Ribumin® only was applied in the soil as negative control while a suspension of nematode eggs were the positive control. The reduction of the number of galls in roots per plant was of 48 and 41% in the treatments with Ribumin® + MIC 14 + Pc-12 and MIC 14 + Pc-12, respectively. Regarding to the number of eggs per plant, MIC 14 and Pc-12 + Ribumin promoted reduction of 26 and 21%, respectively, when compared to the control treatment. The interaction among the fungus and the rhizobacteria was positive for the nematode control, despite that *G. dipsosauri* inhibited *P. chlamydosporia* growth up to 30% in *in vitro* tests.

**Key-words:** root-knot nematode, organic matter, rhizobacteria, alternative control.

**Resumo** – A matéria orgânica exerce papel fundamental na atividade antagonista de microrganismos sobre populações de fitonematoides no solo. Neste trabalho foram avaliados a compatibilidade entre o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc-12) e a rizobactéria *Gracilibacillus dipsosauri* (MIC 14) *in vitro* e o efeito deste fungo a 5000 clamidósporos/g de solo, da rizobactéria a  $4,65 \times 10^9$  células/g de solo, e do condicionador de solo Ribumin® a 10 g/vaso, isoladamente ou em conjunto, sobre *Meloidogyne javanica* em tomateiro (3000 ovos/vaso). Uma suspensão de água ou apenas Ribumin®, foi aplicada ao solo como testemunhas negativas, enquanto uma suspensão de ovos do nematoide foi aplicada como controle positivo. A redução no número de galhas em raízes por planta foi de 48 e 41% nos tratamentos Ribumin + MIC 14 + Pc-12 e MIC 14 + Pc-12, respectivamente. Quanto ao número de ovos por planta, MIC 14 e Pc-12 + Ribumin proporcionaram redução de 26 e 21% respectivamente em relação ao tratamento testemunha. A interação entre o fungo nematófago e a rizobactéria foi positiva para o controle do nematoide, apesar do fato de *G. dipsosauri* ter inibido o crescimento do fungo *P. chlamydosporia* em até 30% em teste *in vitro*.

**Palavras-chaves:** nematoide das galhas, matéria orgânica, rizobactéria, controle alternativo.

## Introduction

The fungus *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) is considered one of the most promising agents for biological control of plant nematodes (8, 14). It is a facultative parasite of eggs and females of cyst and root-knot nematodes (13). Its application into the soil is performed via chlamydospores, once these are survival structures of the fungus possessing nutritional reserves (15). Bacteria inhabiting plant rhizosphere, also known as rhizobacteria, are reported in scientific works as potential agents to control plant nematodes. They act by producing toxic compounds (9, 17), by the modification of root exudates, preventing recognition by the nematodes (18), or by mean of induction of systemic resistance in plants (6, 26).

The combination of biological control agents may enhance the efficiency of such agents, especially when these antagonists act over different stages of the pathogen's life cycle. Dube & Smart Jr (5) observed that soil applications of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre and Starr, resulted in higher population control levels of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood, when compared to control treatments or with antagonist only. Siddiqui & Ehteshamul-Haque (24) also observed similar results in the reduction of *M. javanica* (Treub) Chitwood while using biological control agents *P. chlamydosporia* and *Pseudomonas aeruginosa* simultaneously.

The inclusion of organic matter in the soils is also an alternative for the control of plant parasitic nematodes (22). The addition of organic matter increases the nutrient contents and improves the soil texture, promotes the development of antagonistic microorganisms and its breakdown produces compounds toxic to the nematodes (1, 7, 23).

Utilization of different control strategies in a management system is a good alternative for growing tomatoes in places infested with root-knot nematodes. Thus, it was evaluated in this work the combined effect of the fungus *P. chlamydosporia* (isolate Pc-12), the rhizobacteria *Gracilibacillus dipsosauri* (Lawson *et al.*) Waino *et al* (isolate MIC 14) and the soil conditioner, peat based, Ribumin®, alone or in combination, to control *M. javanica*, under green-house conditions.

### **Material and Methods:**

The biological control agents used in the experiments were the fungus *P. chlamydosporia* (Pc-12) and the rhizobacteria *G. dipsosauri* (MIC 14), previously known to reduce populations of *M. javanica* (9). Both antagonists were obtained from the microorganisms' collection from the Plant Nematode Biological Control Laboratory at Universidade Federal de Viçosa. The commercial soil conditioning product Ribumin®, containing peat and calcium oxide, was obtained from Technes enterprise. It contained 30% organic matter, 35% of maximum humidity, minimum water retention capacity (WRC) of 90%, 12% total organic carbon and cation exchange capacity (CEC) of 900 mmol/kg.

### **Compatibility tests**

Petri plates containing medium Kado 523 (11) or potato dextrose agar (PDA) were used to set two culture disks of *P. chlamydosporia* in opposite positions into each plate, both located at 2,0 cm from the plate border. A microscope slide was submerged into the bacterial suspension of *G. dipsosauri* or water (control) and a scrape was made in the middle of the plate. Petri plates were kept within a growing chamber at 26 °C during five days before evaluating fungal colony diameter. The experiment was performed under a completely random statistical design with three replicates.

### **Inoculum production of antagonists**

The fungus *P. chlamydosporia* was cultivated in sterilized milled corn substrate within autoclavable polypropylene bags and kept in growing chamber in the dark, at 26 °C during 21 days, before chlamydospores extraction by means of substrate washing with tap water and filtering the suspension in a double layer fine cloth. Chlamydospores were counted with the aid of a light microscope and hemacytometer. A total of 5.000 chlamydospores/g of soil were applied for the tests. The bacteria *G. dipsosauri* was transferred to Petri plates containing Kado 523 medium (11) and kept for 24 hours in a growth chamber at 28 °C. After that, 10 ml of tap water were added in each plate and the surface of the culture medium was scraped with the aid of a bent glass rod. The suspension was corrected for optic density ( $OD_{540}$ ) = 0,53, containing  $6,2 \times 10^{11}$  colony forming unit (CFU)/ml. Each pot was inoculated with 3,75 ml of bacterial suspension.

In order to set the experiment in green-house, pots containing 0,5L of soil and sand 1:1 (v:v) as substrate, previously sterilized with methyl bromide, were used. The statistical design used was a completely random design with eight replicates for each treatment. The treatments were: control; Ribumin®; nematode; nematode + Ribumin®; nematode + Ribumin® + MIC 14; nematode + MIC 14; nematode + MIC 14 + Pc-12; nematode + Pc-12; nematode + Ribumin® + Pc-12; nematode + Ribumin® + MIC 14 + Pc-12. Soil conditioner Ribumin® was used at 10 g/pot.

The microorganisms and the soil conditioner were integrated to the soil of each pot by mixed manually in order to promote substrate homogenization, and subsequently it was returned to its respective pot. Then, the soil of each pot was wetted and infested with 3.000 eggs of *M. javanica*. One week after soil infestation, 21 days 'Santa Clara' tomato seedling was transplanted into each pot. After 65 days, the height, mass of the fresh aerial plant portion, mass of the fresh roots and the number of galls and eggs of *M. javanica* per root system of tomato were evaluated.

During the experimental setting and data collecting, soil samples of each treatment were obtained in order to determine the population of the fungus in the soil. Colony Forming Units (CFUs) were determined according Kerry (12), in a semi selective medium (10). Data was submitted to variance analysis and differences between treatment means were compared by the Duncan test of significant difference at  $P < 0,05$  probability.

### **Results and Discussion:**

The association of biological control organisms and organic matter was positive to control the nematode *M. javanica* in tomato, once the simultaneous application of the three agents resulted in the smallest number of galls, indicating less nematode penetration in the plant roots (Table 1), while the application of the fungal isolate Pc-12 alone did not differ from the control in regard to the number of galls. Reduction of 48,27% and 40,57% were observed in treatments with Ribumin+ MIC 14 + Pc-12 and MIC 14 + Pc-12, respectively, when compared to the control.

Concerning to the number of eggs produced per root system, only the treatment with the rhizobacteria MIC 14 and the treatment with the fungal isolate PC-12 applied together with the soil conditioner Ribumin® showed significant difference from the control treatment, reducing in 26,30% and 21,43%, respectively, the number of *M. javanica* eggs. The benefit of using the soil conditioner was obvious, increasing the efficiency of the fungus to reduce the

number of eggs, but the association of the soil conditioner with the bacterium did not result similar effect, once the bacterium was more efficient when applied alone (Table 1). The efficiency of the fungus associated with the soil conditioner was higher in the absence of the bacterium. Association of the bacterium MIC 14 with the fungus PC-12 resulted in lesser reduction in the egg number when compared with the use of both separately without Ribumin®. However, the association of both organisms, with or without soil conditioner, resulted in more expressive reduction in the number of galls. The association of Ribumin® with the fungus was more efficient than its association with the bacterium to reduce the number of nematode eggs.

Previous research works established that mixture of biological control agents increase the potential to control phytopathogenic organisms (16, 20, 21), but each mixture has its own characteristics, that depends on the type of microorganisms involved, their inhibition level, their form of action against the nematode, as well as their relationship with the soil organic matter and the ability of rhizosphere colonization or plant resistance induction. There was a slight reduction of fungal growth in the compatibility test amongst the fungus PC-12 and the bacterium MIC 14 *in vitro* (Table 2). There was also a reduction in the number of colony forming units of PC-12 in pot soil, at the end of the experiment, in treatments where the bacterium was associated with the fungus, when compared with treatments where the fungus was alone or with the conditioner, without the bacterium (Table 1).

The positive effect of the mixture of fungus and bacterium in the reduction of galls number associated or not with Ribumin®, was probably due to the action of plant resistance induced by the bacteria. The fungus *P. chlamydosporia* has slower growth when compared to the bacterium and it acts mainly over nematode eggs. This elucidates why the treatment with only the fungus had no difference from the control treatment regarding to the number of galls. The low control potential of the isolate Pc-12 without the addition of organic matter was previously observed by Dallemole-Giaretta (3), when reporting the inferiority of this isolate compared to

isolate PC-10 concerning nematode control as well as production of chlamydospores. Selection of a competent isolate is very important when the objective is to develop a biological control product, once there is a great difference among isolates of a single fungal or bacterial species (3, 4, 19).

Although tomato plants were transplanted seven days after the application of the biological control agents into the soil, the fungus *P. chlamydosporia* had little effect in destruction of the nematode's eggs, reducing the number of galls in only 2,68 %. When the fungus was applied simultaneously with Ribumin®, more expressive reduction in galls was observed. Nonetheless, this is due to the effect of this soil conditioner over the nematode, once the same result was observed in the treatment with Ribumin® applied solely.

The soil conditioner Ribumin® reduced the number of galls caused by the nematode when used alone or simultaneously with the fungus or the bacterium, with better results when applied together with the bacterium or with both organisms. The integration of organic matter with biological control agents may increase the control potential for plant nematodes, once organic matter may release compounds with nematicidal effect and support the increase of native antagonist population in the soil or serve as substrate for the development and establishment of antagonists applied to the soil (2, 22). Besides that, substrates rich in organic matter may contain natural propagules of other antagonist organisms that may help in nematode control.

The prominent activity of the bacterium MIC 14 may be possible due to the different modes of action that rhizobacteria have over nematodes. They may produce toxic compounds that may influence in nematode's hatching or motility, modify root exudates that may prevent recognition by nematodes or induce systemic resistance in plants. Besides that, rhizobacteria may also promote plant growth (6, 9, 17, 18, 25). This study confirmed once again the great potential of biological control of this rhizobacteria against *M. javanica*, confirming previous results observed by Freitas *et al.* (9).

## Conclusions:

Combination of biological control agents with organic matter such, soil conditioners, is a good alternative for the root-knot nematodes management. The simultaneously use of the rhizobacteria *G. dipsosauri*, (isolate MIC 14), the fungal *P. chlamydosporia* (isolate Pc-12) and the peat based soil conditioner Ribumin®, has a positive effect in reducing populations of the root-knot nematode *M. javanica*, but the different combinations among them result in differential reductions in the number of galls and eggs.

**Acknowledgments:** The authors thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), by the financial support.

## References:

1. Aktar, M.; Malik, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 35-47, 2000.
2. Cannayane, I.; Rajendran, G. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). **Current Nematology**, Allahabad, v. 12, p. 51-55, 2001.
3. Dallemole-Giaretta, R. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
4. De Leij, F.A.A.M.; Kerry, B.R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 14, p. 157-164, 1991.
5. Dube, B.; Smart Jr, G.C. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 19, p. 222-227, 1987.

6. Fabri, C.F.S. **Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne spp.*) em tomateiro por rizobactérias**. 2006. 63 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
7. Ferraz, S.; Dias C.R.; Freitas L.G. Controle de nematóides com práticas culturais. In: Zambolim, L. **Manejo integrado-fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. v. 1, p. 1-52.
8. Freitas, L.G.; Dallemole-Giaretta, R.; Zooca, R.J.F.; Podestá, G.S.; Ferraz, S. Controle biológico de nematóides: estudo de casos. In: Zambolim, L.; Picanço, M.C. **Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. v. 1, p. 41-82.
9. Freitas, L.G.; Neves, W.S.; Fabry, C.F.S.; Marra, B.M.; Coutinho, M.M.; Romeiro, R.S.; Ferraz, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne spp.*) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 215-220, 2005.
10. Gaspard, J.T.; Jaffee, B.A.; Ferris, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, p. 207-213, 1990.
11. Kado, C.I.; Heskett, M.S. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.
12. Kerry, B.R. Methods for studying the growth and survival of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, in soil. **Bulletin SROP**, Darmstadt, v. 14, p. 34-38, 1991.
13. Kerry, B.R. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n.1, p. 65-70, 1995.
14. Kerry, B.R.; Bourne, J.M. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using *Verticillium chlamydosporium*. **Pesticide Science**, Chichester, v. 47, p. 69-75, 1996.

15. Kerry, B.R.; Bourne, J.M. **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potencial biological control agent for root-knot nematodes**. Darmstadt: Druckform GmbH, 2002. 84 p.
16. Meyer, S.F.; Roberts, D.P.; Chitwood, D.J.; Carta, L.K.; Lumsden, R.D.; Mao, W. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. **Nematropica**, Florida, v. 31, p. 75-86, 2001.
17. Oka, Y.; Chet, I.; Spiegel, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdom, v. 3, p. 115-126, 1993.
18. Oostendorp, M.; Sikora, R.A. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nematologie**, Bondy, v. 13, p. 269-274, 1990.
19. Pinho, R.S.C.; Campos, V.P.; Souza, R.M.; Silva, J.R.C.; Oliveira, M.S.; Pimentel, G.C.S.; Costa, L.S.A.S. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, p. 54-60, 2009.
20. Raupach, G.S.; Kloepper, J.W. Mixtures of plant growth – promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, p. 1158-1163, 1998.
21. Roberts, D.P.; Lohrke, S.M.; Meyer, S.L.F.; Buyer, J.S.; Bowers, J.H.; Baker, C.J.; Li, W.; Souza, J.T.; Lewis, J.A.; Chung, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 141-155, 2005.
22. RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Organic and inorganic amendments to soil as nematode supressants. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 18, p. 129-135, 1986.
23. RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; Morgan-Jones, G. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 100, p. 237-247, 1987.

24. Siddiqui, I.A.; Ehteshamul-Haque, S. Effect of *Verticillium chlamyosporium* and *Pseudomonas aeruginosa* in the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 28, p. 193-196, 2000.
25. Siddiqui, I.A.; Shaukat, S.S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamyosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 215-222, 2003.
26. Siddiqui, I.A.; Shaukat, S.S. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 48-54, 2004.

**Table 1** – Effect of *Pochonia chlamydosporia* (Pc-12), *Gracilibacillus dipsosauri* (MIC 14) and soil conditioner Ribumin®, over *Meloidogyne javanica* and development of tomato plants, 70 days after seedling transplantation.

Treatments	Height (cm)	Mass of the aerial portion (g)	Mass of root (g)	Number of root galls	Number of nematode eggs	CUFs/ g soil <sup>1</sup> (X 1.000) <sup>1</sup>
Negative control (without Mj*)	81,14 <sup>ns</sup>	40,55 <sup>ns</sup>	13,99 <sup>ns</sup>	-	-	-
Ribumin (without Mj)	85,57	48,16	13,47	-	-	-
Positive control (Mj)	85,00	39,71	15,38	1.191 a	431.053 a	-
Mj + Ribumin	71,71	42,62	16,80	906 bc	418.880 ab	-
Mj + Ribumin + MIC 14	73,86	43,79	16,72	765 cde	399.520 abc	-
Mj + MIC 14	75,57	37,08	13,74	822 cd	317.680 c	-
Mj + MIC 14 + Pc-12	80,71	38,99	14,05	703 de	409.493 ab	6,6x10 <sup>2</sup>
Mj + Pc-12	83,86	42,64	15,63	1040 ab	356.107 abc	1,0x10 <sup>4</sup>
Mj + Ribumin + Pc-12	73,86	40,86	15,02	955 bc	338.653 bc	2,4x10 <sup>4</sup>
Mj + Ribumin + MIC 14 + Pc-12	77,71	46,06	16,68	616 e	351.853 abc	8,6x10 <sup>3</sup>
<b>CV (%)</b>	15,64	22,20	14,52	18,79	18,71	-

Mean of seven replicates. Mean values followed by the same letter are not statistically different based upon Duncan mean separation test at  $p < 0,05$ . Mj\* = *Meloidogyne javanica*. <sup>ns</sup> = Not significant

<sup>1</sup>Population of *Pochonia chlamydosporia* Pc-12 in the soil 70 days after transplantation of the tomato seedlings, with presence of *Meloidogyne javanica*. Mean values of three replicates.

**Table 2** – Mean of colony radial growth (cm) of *Pochonia chlamydosporia* (Pc-12) five days after the incubation in culture medium PDA or MB1, compared with the bacterium *Gracilibacillus dipsosauri*, isolate (MIC 14).

<b>Treatments</b>	<b>Growth (cm)</b>	<b>Reduction (%)</b>
Pc-12 (Culture medium PDA)	2,90	-
Pc-12 + MIC 14 (Culture medium PDA)	2,47*	14,82
Pc-12 (Culture medium 523)	2,52	-
Pc-12 + MIC 14 (Culture medium 523)	1,76*	30,15

\* Statistically significant by the F test at  $p < 0,05$ .

## Controle de *Meloidogyne javanica* em Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com Bactérias Endofíticas

Guilherme Silva de Podestá<sup>1\*</sup>, Leandro Grassi de Freitas<sup>1</sup>, Deisy Xavier Amora<sup>1</sup>, Érica das Graças Carvalho Nasu<sup>1</sup>, Marcelo Magalhães Coutinho, Silamar Ferraz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa (MG), Brasil. \*Corresponding author: [guilherme.podesta@ufv.br](mailto:guilherme.podesta@ufv.br)

Artigo – Normas Nematopica

### Resumo

O uso do controle biológico no manejo de fitonematoides vem aumentando nos últimos anos, principalmente pelos problemas de saúde e ambientais causados pelos produtos químicos. Entre os organismos utilizados em programas de manejo, destacam-se as rizobactérias. Os objetivos do trabalho foram: Obter isolados bacterianos endofíticos em raízes de plantas antagonistas a nematoides; avaliar e selecionar isolados com efeito negativo sobre a multiplicação de *Meloidogyne javanica*; verificar o efeito sobre a mobilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) em testes *in vitro* e o potencial de controle dos principais isolados sobre *M. javanica* em plantas de tomate em casa de vegetação. Dos 51 isolados obtidos, 18 foram eficientes em reduzir o número de galhas radiculares causadas por *M. javanica*, apresentando de 51 a 75% de controle em relação à testemunha. O número de massas de ovos nas raízes foi menor que a testemunha em cinco isolados, com redução variando de 65 a 75%. Os tratamentos com os isolados Cs-2, Cs-12 e Mc-3 causaram 22, 24 e 27% de imobilidade nos J<sub>2</sub> de *M. javanica*, respectivamente, em relação à testemunha água destilada. No primeiro experimento em casa de vegetação, realizado durante o inverno, não foi observado efeito algum sobre os parâmetros analisados, apenas uma tendência de redução da infecção para os isolados Cs-2 e Mc-3. Já no segundo experimento, realizado durante a primavera, a aplicação dos isolados Cp-5,

Mc-3 e Cs-2 ao solo, proporcionou redução no número de galhas de *M. javanica* em 46, 38 e 32% respectivamente em relação à testemunha. A microbiolização de sementes com o isolado Mc-3 reduziu em 65% o número de ovos de *M. javanica* em relação à testemunha.

**Palavras-chaves:** Controle biológico, *Calotropis procera*, *Crotalaria spectabilis*, *Mucuna pruriens*.

## Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) está entre as hortaliças mais cultivadas no mundo, sendo produzido em mais de 160 países. Os fitonematoides, principalmente *Meloidogyne* spp. estão entre os principais patógenos da cultura. As plantas atacadas apresentam tamanho reduzido, murcha nas horas mais quentes do dia, folhas amareladas, sintomas que se assemelham à deficiência nutricional. Dependendo da densidade populacional, suscetibilidade da cultivar, clima e tipo de solo, as perdas podem chegar a 100% (Lordello, 1982; Ferreira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012). Uma vez presentes na área, sua erradicação é praticamente impossível, e as práticas de manejo aplicadas irão visar à redução da população a níveis onde não causem danos econômicos (Ferraz *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2012).

A população humana está mais consciente acerca dos malefícios associados à utilização de produtos químicos, como é o caso da maioria dos nematicidas. Tanto que vários produtos já foram retirados do mercado por problemas de toxidez em humanos e animais, contaminação de lençóis freáticos e destruição da camada de ozônio (Jatala, 1986; Whitehead, 1997; Kerry, 2001). Desta forma, a busca por alternativas menos tóxicas vem aumentando e o controle biológico assume um papel importante neste contexto (Ferraz *et al.*, 2010)

Um grupo que apresenta várias características interessantes quando se pensa em controle biológico é o das rizobactérias (Kloepper *et al.*, 1990; Stirling, 1991; Ferraz *et al.*, 2010). Essas podem atuar sobre populações de nematoides de várias formas, competindo por espaço ou nutrientes, produzindo sideróforos ou compostos como antibióticos, enzimas e toxinas. Podem induzir resistência sistêmica nas plantas, interferir no reconhecimento entre o

nematoide e os tecidos da planta, ou promover o crescimento das plantas (PGPR), tornando-as mais tolerantes ao ataque destes patógenos. (Oostendorp & Sikora, 1990; Stirling, 1991; Freitas *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2010).

Algumas destas bactérias podem atuar no interior das raízes, sem causar dano algum às plantas. Estas são chamadas de endofíticas e por habitarem o interior dos tecidos podem ser vantajosas como agentes de controle biológico. Colonizam o mesmo tecido que fitopatógenos, ambiente com menor exposição a variações climáticas e menor competição com outros microorganismos (Hallmann *et al.*, 1998). Diversos trabalhos mostram a eficiência destes organismos como agentes de controle biológico de fitonematoides (Siddiqui & Shaukat, 2003; Pinho *et al.*, 2009; Munif *et al.*, 2013).

O sistema radicular de plantas consideradas antagonistas a nematoides possui bactérias endofíticas diferentes daquelas encontradas em outras plantas. Estas bactérias apresentam grande potencial para o controle de fitonematoides (Kloepper *et al.*, 1991). Neste contexto, os objetivos do trabalho foram obter isolados bacterianos endofíticos de raízes das plantas antagonistas, mucuna preta, mucuna cinza (ambas *Mucuna pruriens var utilis*), *Calotropis procera* e *Crotalaria spectabilis*, avaliar e selecionar isolados com efeito sobre a multiplicação de *M. javanica*, verificar o efeito sobre a mobilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) em testes *in vitro*, além do potencial de controle dos principais isolados sobre *M. javanica* em plantas de tomate.

## Material e Métodos

### *Isolamento das bactérias endofíticas*

Foram recolhidas raízes das plantas antagonistas mucuna preta, mucuna cinza (ambas *Mucuna pruriens var utilis*), *Calotropis procera* e *Crotalaria spectabilis*, e estas cortadas em segmentos, lavadas em água corrente e enxugadas com papel absorvente. Em seguida a superfície das raízes foram desinfestadas com etanol 50% (v/v) durante 1 minuto, hipoclorito

de sódio 2% por 7 minutos e lavadas três vezes em água estéril. Os segmentos foram macerados em 5 mL de água estéril com o auxílio de almofariz, deixando em repouso por 15 minutos para a difusão das bactérias na suspensão. Com o extrato resultante do macerado, foi realizado um semeio em meio 523 de Kado & Heskett (1970) utilizando alça de Drigalski. As placas foram mantidas em incubadora a 28 °C por 24 horas. As colônias de morfologia diferentes foram selecionadas e repicadas para tubos de ensaio e esses mantidos em incubadora a 28 °C para crescimento dos isolados.

Para certificação de que os isolados eram endofíticos, uma contraprova foi realizada. As raízes foram desinfestadas da mesma forma citada anteriormente e mergulhadas em meio líquido 523 e imediatamente descartadas. Os tubos foram mantidos em incubadora a 28° C por 24 horas, a fim de comprovar a ausência de crescimento de organismos epifíticos.

#### *Seleção massal dos isolados*

Sementes de tomateiro Santa Cruz 'Kada' foram microbiolizadas através da imersão em suspensão aquosa dos isolados bacterianos e mantidas em temperatura ambiente no laboratório por 24 horas. Para o tratamento testemunha, as sementes permaneceram imersas em água de torneira. Após este período, foram plantadas em tubetes contendo substrato mineral Plantimax. Quando as mudas estavam com dois pares de folhas definitivas, dois mililitros da suspensão de ovos de *M. javanica* contendo 450 ovos foram colocados em cada tubete. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas uma vez por semana com N-P-K e micronutrientes. Após 68 dias retiraram-se as plantas e as variáveis peso da parte aérea, altura das plantas, número de massas de ovos e de galhas por sistema radicular foram avaliadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Duncan, utilizando o programa de sistema para Análises estatísticas STATISTICA 12.0.

#### *Isolados selecionados*

Cinco isolados bacterianos, 25, 26, 2, 49 e 11, foram selecionados por reduzir em mais de 50% o número de galhas de *M. javanica* e por apresentarem compatibilidade *in vitro* com o fungo antagonista *Pochonia*

*chlamydosporia*. Estes foram renomeados para Cp-1, Cp-5, Cs-2, Cs-12 e Mc-3 respectivamente, pois foram coletados em raízes de *Calotropis procera*, *Crotalaria spectabilis* e mucuna cinza. Após sequenciada a região 16S do RNA ribossomal pelo Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade da Universidade federal de Viçosa, os isolados Cp-5, Cs-12 e Mc-3 foram identificados como *Bacillus* spp., e os isolados Cp-1 e Cs-2 como *Enterobacter* spp.

Para os ensaios seguintes, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 e incubados a 28 °C por 24 horas. Em seguida, adicionaram-se às placas 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e as colônias foram raspadas com auxílio de alça de Drigalski. Da suspensão formada, pipetou-se 1,0 mL para erlenmeyer contendo 250 ml de meio 523 de Kado & Heskett (1970) líquido, que foi incubado sob agitação a 100 RPM e 28 °C por 24 horas e em seguida, 37 °C por 96 horas. Após este período, centrifugou-se a suspensão a 10.000 g por 10 minutos e o pellet foi ressuspensão em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão foi calibrada em espectrofotômetro para densidade ótica ( $OD_{540} = 0,5$ ) que corresponde à aproximadamente  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

#### *Nematoide utilizado*

O inóculo de *Meloidogyne javanica* foi mantido em casa de vegetação em vasos contendo plantas de tomate, cultivar “Santa Clara”. Para a obtenção dos ovos utilizados nos experimentos, foi realizada a técnica de extração desenvolvida por Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981), e a suspensão foi calibrada para conter 1000 ovos. mL<sup>-1</sup>. Para a obtenção dos J<sub>2</sub>, ovos foram colocados em funil de Baerman e mantidos a 28°C por 2 dias, quando a suspensão foi calibrada para conter 1000 J<sub>2</sub>. mL<sup>-1</sup>.

#### *Efeito de rizobactérias sobre a mobilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de Meloidogyne javanica*

Em células de 300 µL de placas Elisa foram colocados 20 µL de suspensão contendo aproximadamente 20 J<sub>2</sub> ou 170 ovos de *M. javanica* e 100 µL da suspensão ( $OD_{540}=0,5$ ) dos isolados bacterianos Cp-1, Cp-5, Cs-2, Cs-12 e Mc-3. Como testemunhas, utilizaram-se água destilada e solução salina.

Após 48 horas, avaliaram-se a mobilidade, pela contagem dos nematoides móveis e imóveis, em seguida, avaliaram-se a mortalidade, conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000). A eclosão foi avaliada através da contagem do número de J<sub>2</sub> presentes em cada cavidade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Os dados foram convertidos em porcentagem e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

#### *Aplicação de rizobactérias no solo para o controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

Vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato constituído de uma mistura de solo de barranco e areia, na proporção 1:1(v:v), previamente tratada com o fumigante de solo Dazomet, na dosagem de 50 g/m<sup>2</sup> de solo. Em cada vaso, transplantou-se uma muda de tomate cultivar 'Santa Clara' com 21 dias de idade. Em seguida, foram adicionados ao solo 3,0 mL de suspensão contendo 3000 ovos de *M. javanica* ou apenas água no controle negativo e 20 mL da suspensão (OD<sub>540</sub> = 0,5) do isolado bacteriano a ser testado. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento. Ao final do experimento, avaliaram-se a massa da parte aérea das plantas, altura, massa do sistema radicular, número de galhas e o número de ovos do nematoide. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Este experimento foi conduzido por duas vezes, no inverno e primavera, permanecendo em casa de vegetação por 60 e 45 dias respectivamente.

#### *Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias no controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

Metodologia semelhante à anterior foi utilizada neste experimento, no entanto, os tratamentos consistiram da microbiolização das sementes com os isolados bacterianos, conforme descrito anteriormente. Após isto, três sementes de tomate foram plantadas por vaso e, 15 dias após a germinação, aplicaram-se 3,0 mL de suspensão contendo 3000 ovos de *M. javanica*. No

controle, as sementes foram tratadas apenas com solução salina (0,85%). Decorridos 60 dias, avaliaram-se a massa da parte aérea das plantas, altura, massa do sistema radicular, número de galhas e o número de ovos do nematoide. O experimento foi realizado no verão, conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Duncan a 5% de probabilidade.

## **Resultados e Discussão**

### *Isolamento das bactérias endofíticas*

Foram obtidos 51 isolados de bactérias endofíticas a partir de raízes de mucuna preta, mucuna cinza (ambas *Mucuna pruriens var utilis*), *Calotropis procera* e *Crotalaria spectabilis*.

### *Seleção massal dos isolados*

Dos 51 isolados obtidos, 18 foram eficientes em reduzir o número de galhas de *M. javanica*. Apresentando de 51 a 75% de controle em relação à testemunha (Tabela 1). O número de massas de ovos foi menor que a testemunha em cinco isolados, com redução variando de 65 a 75% (Tabela 1). Estes dados confirmam que o sistema radicular de plantas antagonistas possui microorganismos adaptados, com grande potencial para o controle de fitonematoides (Kloepper *et al.*, 1991). Pois neste caso, 35% das bactérias selecionadas foram eficientes em reduzir o número de galhas de *M. javanica*.

Não houve estímulo significativo do crescimento vegetativo das plantas de tomate pelas bactérias endofíticas, quando comparadas com o tratamento controle (dados não apresentados), portanto mesmo os isolados que atuaram no controle biológico do nematoide não apresentaram comportamento de promotoras de crescimento de plantas, conhecidas pela sigla em inglês PGPR.

Tabela 1. Efeito da microbiolização de sementes com bactérias endofíticas sobre o número de galhas e massas de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiros inoculados com 450 ovos/tubete.

Isolado (nº)	Galhas	Massas de Ovos	Isolado (nº)	Galhas	Massas de Ovos
49	14 a	9 a	42	32 abcde	22 ab
30	16 ab	11 a	13	32 abcde	19 ab
34	17 abc	12 a	36	32 abcde	21 ab
26	20 abcd	17 ab	14	33 abcde	19 ab
35	20 abcd	14 ab	29	33 abcde	24 ab
25	21 abcd	12 a	5	33 abcde	24 ab
7	22 abcd	12 a	48	34 abcde	21 ab
12	23 abcd	13 ab	41	34 abcde	22 ab
27	23 abcd	13 ab	17	34 abcde	23 ab
11	24 abcd	16 ab	1	35 abcde	27 ab
2	25 abcd	15 ab	6	36 abcde	27 ab
51	26 abcd	15 ab	8	36 abcde	24 ab
4	26 abcd	18 ab	16	37 abcde	26 ab
39	26 abcd	15 ab	44	37 abcde	22 ab
37	26 abcd	16 ab	47	37 abcde	24 ab
31	27 abcd	17 ab	19	38 abcde	26 ab
40	27 abcd	14 ab	3	39 abcde	26 ab
32	27 abcd	18 ab	43	39 abcde	28 ab
9	28 abcde	13 ab	46	39 abcde	23 ab
33	29 abcde	15 ab	22	40 abcde	25 ab
28	29 abcde	19 ab	23	40 abcde	25 ab
18	29 abcde	17 ab	50	40 abcde	23 ab
45	31 abcde	19 ab	15	43 bcde	26 ab
21	31 abcde	17 ab	20	45 cde	30 ab
38	31 abcde	18 ab	24	47 de	29 ab
10	32 abcde	21ab	Testemunha	56 e	36 b

\* Diferentes letras nos tratamentos indicam diferenças pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

*Efeito das rizobactérias sobre a mobilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de Meloidogyne javanica*

Os tratamentos com os isolados Cs-2, Cs-12 e Mc-3 causaram 22, 24 e 27% respectivamente de imobilidade nos J<sub>2</sub> de *M. javanica* em relação à testemunha água destilada. Nenhum dos tratamentos mostrou efeito sobre a mortalidade ou sobre a eclosão de J<sub>2</sub> (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados por Abo-Elyousr *et al.* (2010), em que isolados rizobacterianos proporcionaram imobilização dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* e não causaram mortalidade nos mesmos, em testes realizados *in vitro*. Outros autores já verificaram o efeito de isolados bacterianos também na mortalidade dos J<sub>2</sub> (Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2001; Siddiqui e Shaukat, 2004; Ribeiro *et al.*, 2012). Isto demonstra que as rizobactérias variam quanto ao mecanismo

de ação contra os fitonematoides. Antibióticos e outros compostos tóxicos presentes nos metabólitos bacterianos podem ser responsáveis pela imobilização e mortalidade dos nematoides (Stirling *et al.*, 1991; Abo-Elyousr *et al.*, 2010). Caso o efeito sobre a mobilidade dos nematoides seja efetivo também sob condições de cultivo, espera-se que resulte em redução da infecção causada pelos mesmos.

Tabela 2. Porcentagem de imobilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne javanica* submersos em suspensão de isolados bacterianos

Tratamentos	Imobilidade de J <sub>2</sub> (%)	Mortalidade de J <sub>2</sub> (%)	Eclosão de J <sub>2</sub> (%)
Água destilada	4,1 a	1,3 <sup>ns</sup>	4,9 <sup>ns</sup>
Solução salina	6,9 a	0,0	4,3
Isolado Cp-1	10,1 a	1,4	4,1
Isolado Cp-5	10,2 a	1,5	3,4
Isolado Cs-2	21,9 b	1,4	3,4
Isolado Cs-12	23,5 b	1,4	3,5
Isolado Mc-3	27,0 b	2,8	3,4

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### *Aplicação de rizobactérias no solo para o controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

No primeiro experimento, realizado durante o inverno, não foi observado efeito algum sobre os parâmetros analisados, apenas uma tendência de redução da infecção para os isolados Cs-2 e Mc-3 (Tabela 3). Já no segundo experimento, realizado durante a primavera, a aplicação dos isolados Cp-5, Mc-3 e Cs-2 ao solo, proporcionou redução no número de galhas de *M. javanica* em 46, 38 e 32% respectivamente em relação à testemunha (Tabela 3). Neste, observaram-se presença de novas galhas, oriundas de um novo ciclo do nematoide. Quanto ao número de ovos, novamente não foi observada diferença entre os tratamentos no primeiro experimento. Já no segundo, a aplicação do isolado Cs-12 aumentou o número de ovos em relação à testemunha em 58%. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha.

As baixas temperaturas ocorridas durante o primeiro experimento, provavelmente atrapalharam o efeito das rizobactérias sobre o nematoide das

galhas. O maior desenvolvimento embrionário, multiplicação celular e eclosão dos J<sub>2</sub> de *M. javanica* ocorre a 28° C, estes processos tornam-se mais lentos com a redução da temperatura (Campos *et al.*, 2008). Com isto, o efeito nematostático exercido pelas bactérias foi menor, não garantindo redução significativa da infecção causada pelos nematoides.

A redução da infecção causada pelos nematoides com a aplicação dos isolados Mc-3 e Cs-2 pode ser devido à produção de antibióticos e outros compostos tóxicos, afetando principalmente a locomoção dos J<sub>2</sub>, como mostrado no teste *in vitro* (Tabela 2). Lian *et al.* (2007), identificaram a produção de proteases com efeito sobre a cutícula dos nematoides por isolados de *Bacillus* spp. A falta de efeito sobre o número de ovos no segundo experimento, apesar de haver diferença no número de galhas pode ser explicada pelo ciclo do nematoide. Em condições favoráveis, 45-50% dos juvenis de *M. javanica* eclodem 6 dias após sua aplicação ao solo, e sua mobilidade é máxima a 25 °C (cerca de 80%) e reduz, à medida que a temperatura se distancia deste valor (Perry *et al.*, 2009). Como no tratamento testemunha não houve efeito nematostático, os J<sub>2</sub> devem ter infectado o sistema radicular mais rapidamente, completando seu ciclo com a postura de ovos. Desta forma, liberando J<sub>2</sub> para infectar novas raízes e gerar mais galhas. A maioria das espécies de *Meloidogyne* produz certa quantidade de ovos com desenvolvimento mais lento, desta forma, mantém-se uma população residual nas massas de ovos, quando a maioria dos J<sub>2</sub> já eclodiu (Perry *et al.*, 2009). Por isso, encontraram-se certa quantidade de ovos no tratamento testemunha. Nos tratamentos com a suspensão bacteriana, onde se observou efeito sobre a mobilidade dos J<sub>2</sub>, esses demoraram a infectar as raízes e no momento da coleta dos dados, as fêmeas ainda estavam em processo de postura de ovos.

A bactéria Cs-12, que apresentou maior percentual de controle sobre o nematoide das galhas na seleção massal, de alguma forma perdeu sua efetividade, passando a estimular a multiplicação do nematoide no interior da raiz. A inconsistência do controle exercido por rizobactérias já foi relatada anteriormente (Racke & Sikora, 1992; Medeiros *et al.*, 2009). Por este fato, a escolha destes agentes de controle biológico deve ser cuidadosa e envolver várias avaliações.

Tabela 3. Efeito da aplicação de suspensão bacteriana no número de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiros inoculados com 3000 ovos/vaso.

Tratamentos	Experimento 1				Experimento 2			
	Galhas		Ovos		Galhas		Ovos	
	Nº	Redução (%)	Nº	Redução (%)	Nº	Redução (%)	Nº	Redução (%)
Testemunha	548 <sup>ns</sup>	-	46949 <sup>ns</sup>	-	867 a	-	100647 ab	-
Cp-1	463	15	43888	7	686 ab	21	109940 ab	-9
Cp-5	460	16	59696	-27	469 c	46	90884 b	10
Cs-2	357	35	42120	10	590 bc	32	87184 b	13
Cs-12	628	-15	72592	-55	742 ab	14	158556 a	-58
Mc-3	437	20	39867	15	540 bc	38	100428 ab	0

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### *Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias no controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

Neste experimento, não foi observado efeito sobre o número de galhas em nenhum dos tratamentos. Entretanto, a microbiolização de sementes com o isolado Mc-3 reduziu em 65% o número de ovos de *M. javanica* em relação à testemunha (tabela 4). Os demais tratamentos não diferiram da testemunha. Como as rizobactérias foram aplicadas via microbiolização de sementes, provavelmente não ocorreu efeito direto de imobilização sobre os J<sub>2</sub>, por não haver alta concentração bacteriana na superfície radicular. Entretanto, outro mecanismo de ação parece atuar proporcionando grande redução no número de ovos produzidos pelas fêmeas de *M. javanica* quando as sementes são microbiolizadas com Mc-3.

Em diversos trabalhos pode ser observado que alguns isolados bacterianos são capazes de reduzir o número de ovos produzidos pelos nematoides, sem que haja a redução da penetração e formação de galhas. Medeiros *et al.* (2009), observaram que a aplicação de *Bacillus* sp. (isolado ENM51) não apresentou efeito sobre o número de galhas e reduziu em 64% o número de massas de ovos de *M. incognita* em melão. Isolados de *Bacillus* spp. capazes de colonizar o sistema radicular de tomateiro, reduzindo número de ovos e não o de galhas de *M. incognita*, foram relatados por Pinho *et al.* (2009). Acredita-se que a rizobactéria ou metabólito produzido por ela possa

afetar a formação e desenvolvimento das células gigantes, assim as fêmeas não conseguem obter reservas suficientes das células gigantes, afetando a reprodução do nematoide (Freitas, 2001). O isolado Mc-3, apesar de não reduzir a infecção pelo nematoide, foi eficiente em reduzir a produção de ovos. Neste caso, a redução na reprodução do nematoide apresentada pelo isolado Mc-3 irá resultar em redução dos danos causados pelos ciclos subsequentes do nematoide.

Tabela 4. Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias no número de galhas e ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiros inoculados com 3000 ovos/vaso.

Tratamento	Galhas		Ovos	
	Número	Redução (%)	Número	Redução (%)
Testemunha	6325 <sup>ns</sup>	-	411060 a	-
Cp-1	7225	-14	283920 ab	31
Cp-5	6985	-10	315120 ab	23
Cs-2	6115	3	306020 ab	26
Cs-12	5110	19	320320 ab	22
Mc-3	6869	-9	144820 b	65

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado Mc-3 atuou de duas maneiras distintas sobre o nematoide das galhas. Quando aplicado via irrigação, em plântulas já transplantadas, causou certa imobilidade nos J<sub>2</sub>, o que retardou o ciclo do nematoide, resultando em redução do número de galhas. Quando as sementes foram microbiolizadas, ocorreu redução na multiplicação do nematoide, com redução do número de ovos. No processo de germinação das sementes, ocorre a liberação de carboidratos e aminoácidos em abundância (Lynch, 1978), o que facilita a colonização radicular. Isolados mais eficientes em utilizar estes exudatos irão colonizar as raízes mais rapidamente (Kloepper *et al.*, 1985). Portanto, o isolado Mc-3 pode ter colonizado mais eficientemente o sistema radicular do tomateiro, quando houve a microbiolização das sementes, atuando no interior das raízes e reduzindo assim, a multiplicação do nematoide. Provavelmente a

associação das formas de aplicação confira um aumento de eficiência ao isolado Mc-3.

A seleção de isolados eficientes é de suma importância quando se busca desenvolver um produto de controle biológico. A falta de estabilidade deste tipo de produto é um dos principais problemas na fase de desenvolvimento. Por se tratar de organismos vivos, muitas vezes perde-se efetividade com variações de temperatura, umidade, radiação entre outros fatores. Bactérias do gênero *Bacillus* spp. produzem esporos de resistência sob condições adversas, o que representa uma vantagem sobre outros antagonistas (Dawar *et al.*, 2010). Além disso, diversos autores já demonstraram a eficiência de isolados de *Bacillus* spp. no manejo de fitonematoides (Pinho *et al.*, 2009; Souza Jr *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

No grupo das bactérias endofíticas testadas, encontram-se isolados promissores para o manejo do nematoide das galhas. Entretanto, a forma de aplicação, fatores ambientais e a cultura plantada irão influenciar no mecanismo de ação das bactérias sobre estes. De maneira geral, os isolados Cs-2, Cp-5 e Mc-3 mostraram-se promissores para a utilização via irrigação do solo, principalmente por retardar o ciclo do nematoide. Como o tomateiro permanece no campo por vários meses, o retardo no ciclo do nematoide irá reduzir os danos causados à cultura. Além disso, o isolado Mc-3 mostrou-se eficiente também na microbiolização de sementes, reduzindo grandemente a multiplicação do nematoide no interior das raízes.

## Referências

- ABO-ELYOUSR, K.A.; KHAN, Z.; AWARD, M.E. & ABEDEL-MONEIM, M.F. 2010. Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp. for control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. *Nematropica* 40: 289-299.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6: 553 (Suplemento).
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. & POZZA, E.A. 2008. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, 34: 29-33.
- CHEN, S.Y., AND D.W. DICKSON. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 32: 117- 121.
- DAWAR, S.; WAHAB, S.; TARIQ, M. & ZAKI, M.J. 2010. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43: 412-418.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Editora UFV, Viçosa. 304 p.
- FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S. & FREITAS, L.G. 2012. Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). *O essencial da fitopatologia*. Editora Suprema, Viçosa, p. 203-222.
- FREITAS L.G. 2001. Rizobactérias versus nematóides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7. *Anais*. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. p. 25-35.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2012. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L., JESUS JUNIOR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). *O essencial da fitopatologia*. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128.
- HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN A.; RODRIGUEZ-KÁBANA R. & KLOEPPER J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and

endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 925-937.

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

JATALA, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 453-489.

KADO, C.I & HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60: 969-979.

KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C. & MAGAN, N. (ed). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, 380 p.

KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MCINROY, J.A. & COLLINS, D.J. 1991. Analyses of populations and physiological characterization of microorganisms. *Plant and Soil*, 136: 95-102.

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

KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICS, R.M.; TIPPING, E.M. & LIFSHITZ, R. 1990. Plant growth-promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L. & CREGAN, P.B. (ed). *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 315-326.

LIAN, L.H.; TIAN, B.Y.; XIONG, R.; ZHU, M.Z.; XU, J. & ZHANG, K.Q. 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 262-269.

LORDELLO, L.G.E. 1982. *Nematoides das plantas cultivadas*. 7 ed. Nobel, São Paulo, 314 p.

LYNCH, J.M. 1978. Microbial interaction around imbibed seeds. *Annals of Applied Biology* 89: 165-167.

MEDEIROS, J.E.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R. & PEDROSA, E.M.R. 2009. Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. Horticultura Brasileira, 27: 319-324.

MUNIF, A.; HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. 2013. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. Journal ISSAAS, 2: 68-74.

OOSTENDORP, M. & SIKORA, R. 1990. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. Revue de Nematologie, 13: 269-274.

PERRY, R.N.; MOENS, M. & STARR, J.L. 2009. Root-knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK and Cambridge, 488 p.

PINHO, R.S.C.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M.; SILVA, J.R.C.; OLIVEIRA, M.S.; PIMENTEL, G.C.S. & COSTA, L.S.A.S. 2009. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. Nematologia Brasileira, 33: 54-60.

RACKE, & SIKORA, R.A. 1992. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Soil Biology and Biochemistry, 24: 521-526.

RIBEIRO, R.C.F.; CAMPOS, V.P.; XAVIER, A.A.; ROCHA, L.S.; SOUZA, H.B.; AGUIAR, F.M.; SOUZA, R.M.; MIZOBUTSI, E.H. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2012. Control of *Meloidogyne javanica* and Panama disease with rhizobacteria. Nematropica, 42: 218-226.

SIDDIQUI I.A. & EHTESHAMUL-HAQUE S. 2001. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aevuginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. Plant Soil, 237: 81-89.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. 2003. Endophytic bacteria prospects and opportunities for the biological control of plant parasitic nematodes. Nematologia Mediterranea, 31: 111-120.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Journal of Phytopathology, 152: 48-54.

SOUZA JR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFFER, J.T.; CORRÊA, B.O. & GOMES, C.B. 2010. Biocontrole da queima das bainhas e do nematoide das galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 1259-1267.

STIRLING, G.R. 1991. *Biological control of plant-parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects*. Wallingford, U.K: CAB International. 282 p.

WHITEHEAD, A.G. 1997. *Plant nematode control*. Wallingford: CAB International. 384 p.

## Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e Rizobactérias no Controle de *Meloidogyne javanica*

Guilherme Silva de Podestá<sup>1\*</sup>, Leandro Grassi de Freitas<sup>1</sup>, Leonardo Domingues Figueiredo<sup>1</sup>, Deisy Xavier Amora<sup>1</sup>, Érica das Graças Carvalho Nasu<sup>1</sup>, Silamar Ferraz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa (MG), Brasil. \*Autor para correspondência:

[guilherme.podesta@ufv.br](mailto:guilherme.podesta@ufv.br)

### Artigo – Normas Nematropica

#### Resumo

O controle biológico de fitonematoides vem aumentando em proporção nos últimos anos. Em campos supressivos a nematoides, a ocorrência de mais de um antagonista é frequente. Desta forma, o objetivo do trabalho foi testar a interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *M. javanica* em tomate. Nos testes realizados *in vitro*, observou-se que o fungo não produziu compostos antibióticos contra nenhum dos isolados bacterianos testados. Os isolados Cs-2, Cs-12, Cp-1 e Mc-3 foram os que apresentaram maior compatibilidade nos testes de antibiose, efeito dos compostos voláteis e confrontação direta. Testando a interação entre *P. chlamydosporia* (Pc-10) e os isolados selecionados, quando aplicados via microbiolização de sementes, observou-se que o tratamento com a bactéria Mc-3 proporcionou redução de 23% no número de ovos do nematoide. A combinação da bactéria Cs-2 com Pc-10 proporcionou redução de 31% e a combinação das três bactérias com *P. chlamydosporia* proporcionou redução de 37%. Na aplicação via irrigação, Pc-10 isoladamente reduziu o número de galhas em 33% e quando associado a Mc-3, em 30%. Já quanto ao número de ovos as reduções foram de 64, 60 e 49% quando o solo foi tratado com Mc-3, Pc-10 e na interação de ambos, respectivamente.

**Palavras chaves:** Controle biológico, fitonematoides, antagonistas.

## Introdução

Os fitonematoides são patógenos extremamente importantes para a agricultura mundial. Estima-se que as perdas causadas por eles sejam superiores a 150 bilhões de dólares ao ano (Abad *et al.*, 2008). Dependendo de fatores como espécie presente na área, clima, tipo de solo e cultivar plantada, podem causar desde redução da produtividade até a inviabilização de áreas para o plantio de diversas culturas (Tihohod, 1993; Freitas *et al.*, 2012). Como é o caso do tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*), que é cultivado em mais de 160 países, sendo uma das hortaliças mais produzidas no mundo.

Segundo estudo realizado em conjunto por nematologistas de todo o mundo na década de 1980, as perdas devido aos nematoides chegaram a 20,6% da produção anual de tomate (Sasser & Freckman, 1987). Em plantações atacadas pelos nematoides das galhas, as plantas podem apresentar tamanho reduzido, murcha nas horas mais quentes do dia, folhas amareladas, sintomas que se assemelham à deficiência nutricional, devido à formação das células gigantes na região vascular das raízes, que interferem no fluxo de água e nutrientes do solo para a parte aérea das plantas (Perry *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012).

Para o manejo desses fitonematoides, o princípio da exclusão é o mais importante, pois uma vez presentes na área, sua erradicação é praticamente impossível (Ferraz *et al.*, 2010). Em locais infestados, diversas medidas podem ser adotadas para o manejo destes patógenos. Entre elas, o controle biológico tem ganhado força, principalmente pela maior conscientização da população quanto aos malefícios causados pela utilização de produtos químicos (Cook & Backer, 1983). Centenas de organismos já foram identificados como antagonistas à fitonematoides. Os principais são algumas espécies de fungos e bactérias (Kerry, 1990; Stirling, 1991; Freitas *et al.*, 2009).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um dos principais organismos utilizados para o controle biológico de nematoides (Kerry & Bourne, 1996; Lopes *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2009; Guiné *et al.*, 2013; Manzanilla-Lopez *et al.*, 2013). Apresenta diversas características interessantes para um agente de controle biológico. Não causa danos à saúde humana e de animais, é eficiente no manejo do nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp. e também diversos

outros gêneros como *Heterodera*, *Globodera*, *Rotylenchulus*, produz clamidósporos, entre outros (Freitas *et al.*, 2009; Manzanilla-Lopez *et al.*, 2013). Além disso, *P. chlamydosporia* pode promover o crescimento de plantas, aumentando o conteúdo de macronutrientes nas plantas (Dallemole-Giaretta *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009; Marciá-Vicente *et al.*, 2009; Monteiro, 2014).

O fungo apresenta comportamento multitrófico, pode atuar como saprófita, se desenvolvendo na matéria orgânica presente no solo, como parasita, atuando sobre fêmeas sedentárias, ovos de nematoides e outros organismos, além de se estabelecer no interior do tecido radicular de plantas, como endofítico (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2013). *P. chlamydosporia* age sobre os ovos corrompendo as camadas vitelínica, de quitina e lipídios, levando os juvenis à morte (Morgan-Jones *et al.*, 1983). Além disso, a eclosão dos juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) é afetada pela presença do fungo (Stirling, 1991; Mukhtar & Pervaz, 2003).

Outro grupo que possui várias características desejáveis como agentes de controle biológico é o das rizobactérias, que é composto por espécies que colonizam a rizosfera e rizoplane das plantas. Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, são as mais abundantes nessa área, e também as mais utilizadas em programas de controle biológico (Kloepper *et al.*, 1990; Stirling, 1991). Atuam sobre populações de nematoides induzindo resistência sistêmica nas plantas, interferindo no reconhecimento entre o nematoide e os tecidos da planta, competindo por espaço ou nutrientes, produzindo sideróforos ou produzindo compostos como antibióticos, enzimas e toxinas. Além de atuarem como bactérias promotoras de crescimento (PGPR). (Oostendorp & Sikora, 1990; Siddiqui & Shaukat, 2004; Fabri, 2006; Ferraz *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

Existe um grupo de rizobactérias que se estabelece no interior dos tecidos da planta, sem causar dano algum ao hospedeiro. As bactérias endofíticas são muito estudadas em programas de controle biológico de fitonematoides (Siddiqui & Shaukat, 2003; Pinho *et al.*, 2009; Munif *et al.*, 2013). Por colonizarem o mesmo tecido que os patógenos, ambiente com menor exposição a variações climáticas e menor competição com outros

microrganismos, são interessantes como agentes de controle biológico (Hallmann *et al.*, 1998). Segundo Kloepper *et al.* (1991), bactérias endofíticas encontradas no sistema radicular de plantas consideradas antagonistas a nematoides apresentam grande potencial para o controle de fitonematoides.

A interação de antagonistas pode ser uma alternativa para se aumentar a eficiência do controle biológico, podendo reunir vários mecanismos de ação contra o patógeno alvo. Quando os organismos possuem diferentes mecanismos de ação ou atuam sobre diferentes estágios do ciclo de vida do patógeno, o efeito sobre populações de nematoides tende a ser superior (Dubbe & Smart Jr, 1987; Siddiqui & Ehteshamul-Haque, 2000; Siddiqui & Shakaut, 2003; Siddiqui & Akhtar, 2009). Em solos supressivos, o fitonematoide e a planta hospedeira coabitam em ambientes favoráveis à ocorrência de doença, entretanto, a população do patógeno é mantida em níveis onde não causam danos. A presença de vários antagonistas é um dos principais fatores para a ocorrência deste fenômeno (Stirling, 1991).

A combinação entre fungos parasitas de ovos e fêmeas, com rizobactérias, pode ser uma boa alternativa para aumentar a efetividade do controle biológico. Siddiqui & Akhtar, (2009), observaram que a aplicação de *P. chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* ou *Trichoderma harzianum* em conjunto com as rizobactérias, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* ou *Burkholderia cepacia*, é mais eficiente, que a utilização de qualquer antagonista isoladamente, no controle de *M. incognita* em tomate. Além das combinações tenderem a aumentar o efeito de promoção de crescimento conferido pelas rizobactérias.

Neste contexto, os objetivos do trabalho foram: avaliar a compatibilidade “in vitro” entre *P. chlamydosporia* e bactérias endofíticas pré-selecionadas por seu potencial de controle sobre fitonematoides; verificar o efeito da interação entre *P. chlamydosporia* e isolados compatíveis, aplicados via microbiolização de sementes, no controle de *M. javanica* em tomateiros cultivados em casa de vegetação; avaliar a aplicação de Mc-3 e Pc-10 via irrigação, no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiros cultivados em casa de vegetação.

## **Material e Métodos**

Os isolados bacterianos Cp, Cp-1, Cp-5, Cp-6, Cp-13, Cp-14, Cs-2, Cs-12, Mc-3, Mc-4 e Mp-7, utilizados nos experimentos pertencem à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, do Departamento de Fitopatologia da UFV. Estes foram obtidos de raízes de plantas antagonistas a nematoides e pré-selecionados em testes realizados com grande quantidade de isolados. Para os experimentos, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970), e incubados a 28 °C por 48 horas. Em seguida, adicionaram-se às placas 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e as colônias foram raspadas com auxílio de alça de Drigalski. Da suspensão formada, pipetaram-se 1,0 mL para erlenmeyer contendo 250 mL de meio 523 líquido, que foi mantido sob agitação a 100 RPM e 28 °C por 24 horas, e em seguida 37°C por 96 horas. Após este período, centrifugou-se a suspensão a 10.000g por 10 minutos e o pellet foi resuspenso em solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão foi calibrada em espectrofotômetro para densidade ótica ( $OD_{540} = 0,5$ ), que corresponde à aproximadamente  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

O inóculo de *M. javanica* foi mantido em casa de vegetação em vasos contendo plantas de tomate do cultivar Santa Clara. Os ovos foram retirados das raízes conforme a técnica de extração desenvolvida por Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981), e a suspensão foi calibrada para conter 1000 ovos. mL<sup>-1</sup>. Para a obtenção dos J<sub>2</sub>, ovos foram colocados em funil de Baerman e mantidos a 28 °C por três dias, quando a suspensão foi calibrada para conter 1000 J<sub>2</sub>. mL<sup>-1</sup>.

### *Compatibilidade "in vitro" entre P. chlamydosporia e rizobactérias*

#### *Antibiose por difusão em dupla camada*

Foram realizados pequenos círculos de crescimento bacteriano, no centro de placas de Petri (9,0 cm), em meio sólido 523, com o auxílio de uma alça de repicagem. As placas foram mantidas na incubadora por 24 h a 28 °C, e depois da confirmação do crescimento bacteriano, foram expostas à luz ultravioleta por 30 minutos, em seguida, foi adicionado 1 mL de clorofórmio nas tampas das placas, que permaneceram fechadas e invertidas por 1 hora, a fim de confirmar a morte do organismo. Após a evaporação do produto, foi

realizada uma sobrecamada composta por meio de cultura BDA fundente, contendo 1 µL de suspensão de esporos de *P. chlamydosporia* por mL de meio. Cada placa contendo um isolado de *Bacillus* spp. e sobrecamada com suspensão micelial compôs uma unidade experimental.

Metodologia semelhante foi utilizada para verificar se algum composto produzido por *P. chlamydosporia* seria capaz de inibir o crescimento dos isolados bacterianos. Para isto, em placas de Petri (9,0 cm), contendo meio de cultura BDA foi adicionado um disco de membrana de diálise (8,0 cm), sobre o qual, adicionou-se um disco de micélio (5,0 mm) no centro. Após sete dias, o celofane contendo as estruturas do fungo foi retirado da placa, e esta foi exposta à luz ultravioleta e clorofórmio, assim como anteriormente. Realizou-se uma sobrecamada composta por meio de cultura 523 fundente, contendo 1 µL de suspensão bacteriana por mL de meio.

As placas foram mantidas a 28 °C e as avaliações foram realizadas através da verificação de formação de halos de inibição quatro dias após sua incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

#### *Produção de compostos voláteis*

Placas de Petri de 9,0 cm foram posicionadas umas de frente para as outras, após ter sido vertido o meio BDA em uma delas e 523 na outra. Na extremidade inferior da placa, foram aplicados e espalhados com auxílio de uma alça de drigalsky, 200 µL do isolado bacteriano a ser testado. Na outra, um disco de micélio de 1,0 cm de *P. chlamydosporia* foi plantado no centro da placa. As placas foram vedadas lateralmente com membrana plástica e, em seguida, foram mantidas a 26 °C, por 15 dias no escuro.

As avaliações foram realizadas através da medição das colônias fúngicas e comparação com o controle contendo somente *P. chlamydosporia*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

#### *Antibiose por confrontação direta*

Em placas de Petri contendo meio 523 ou BDA foram plantados dois discos de cultura de *P. chlamydosporia*, em lados opostos, a 2,0 cm do bordo

da placa. Uma alça de repicagem foi submersa na suspensão bacteriana ou água (controle) e uma risca foi realizada no centro da placa. Estas foram mantidas a 26 °C por cinco dias, antes da avaliação do diâmetro da colônia fúngica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento.

#### *Interação entre P. chlamydosporia e Bacillus spp. para o controle de M. javanica em tomate*

Vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato constituído de uma mistura de terra de barranco e areia, na proporção 1:1, previamente tratada com Dazomet, na dosagem de 50 g/m<sup>2</sup> de solo. No substrato de cada vaso foram semeadas três sementes de tomate Santa Clara, previamente microbiolizadas com CP-5, CS-2, MC-3, mistura dos três isolados, Pc-10, ou com uma combinação do fungo com os tratamentos com bactérias. Vinte e um dias após a germinação das sementes, foram adicionados ao solo 5,0 mL de suspensão contendo 4000 ovos de *M. javanica* ou apenas água no controle negativo. Para o controle positivo, o solo foi infestado apenas com o nematoide.

Decorridos 60 dias, foram avaliados a massa parte aérea fresca e seca, altura das plantas, peso do sistema radicular, número de galhas radiculares e o número de ovos do nematoide. O experimento foi realizado no verão, com sete repetições por tratamento e delineamento inteiramente casualizado, em temperatura máxima média 37 °C e temperatura mínima média 17 °C.

#### *Aplicação de Mc-3 e Pc-10 via irrigação, no controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

Vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato constituído de uma mistura de terra de barranco e areia, na proporção 1:1, previamente tratada com Dazomet, na dosagem de 50 g/m<sup>2</sup> de solo. Em cada vaso, transplantou-se uma muda de tomate 'Santa Clara' com 21 dias de idade. Em seguida, foram adicionados ao solo 3,0 mL de suspensão contendo 3000 ovos de *M. javanica* ou apenas água no controle negativo e 40 mL da suspensão (OD<sub>540</sub>=0,5) do isolado bacteriano Mc-3, selecionado por sua eficiência nos testes anteriores. O experimento foi conduzido em delineamento

inteiramente casualizado com sete repetições por tratamento. Ao final do experimento, foi coletada uma amostra composta por 3 g de solo por vaso, de cada tratamento, para determinar a população do fungo e da bactéria no solo. As unidades formadoras de colônias (UFCs) do fungo foram determinadas após diluições em série e semeio em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.* 1990). Já a população bacteriana foi avaliada após semeio em meio de cultura 523. O experimento foi realizado no outono, durante 50 dias, com sete repetições por tratamento e delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Duncan a 5% de probabilidade.

## **Resultados e Discussão**

### *Antibiose por difusão em dupla camada*

Nestes testes, o fungo não produziu compostos antibióticos contra nenhum dos isolados bacterianos testados (tabela 1). Entretanto, diversos isolados bacterianos produziram compostos que inibiram o crescimento de *Pochonia chlamydosporia*. Os isolados que não produziram tais antibióticos foram: Cs-12, Cp-1 e Cs-2. O isolado Mc-3 gerou a formação de um pequeno halo de inibição, enquanto os demais inibiram fortemente o crescimento de *P. chlamydosporia* (tabela 1).

### *Produção de compostos voláteis*

Os isolados bacterianos Cs-2, Cs-12 e Mc-3 não reduziram significativamente o crescimento de *P. chlamydosporia* (tabela1).

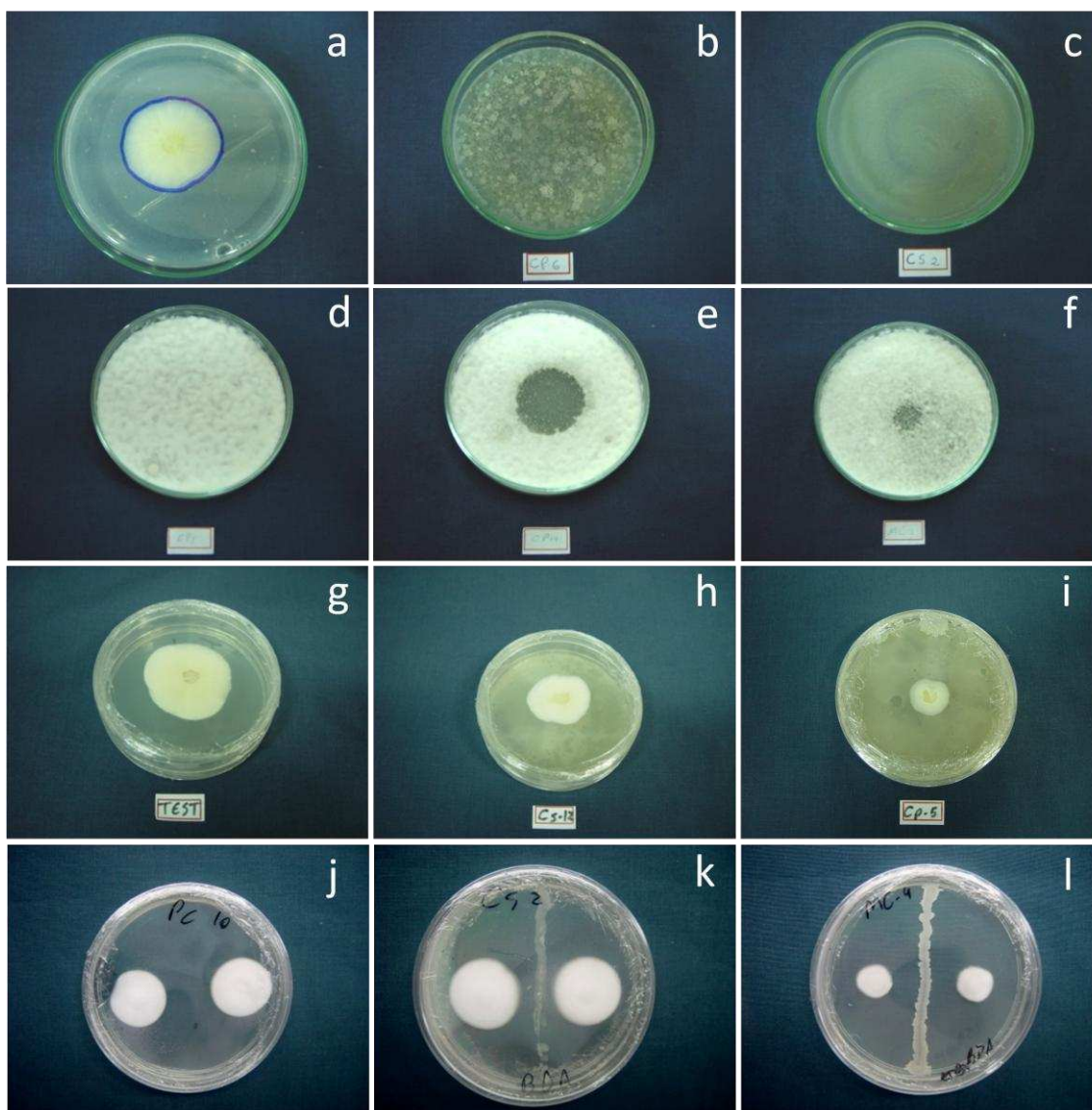
### *Antibiose por confrontação direta*

Nestes testes, os isolados bacterianos proporcionaram diversos níveis de redução no crescimento fúngico, gerando colônias com menor diâmetro. As reduções chegaram a 56% com o isolado Mp-7 e 64% com o isolado Cp-13. O isolado Cs-2 não causou redução no diâmetro da colônia de *P. chlamydosporia* em nenhum dos meios de cultura testados. Além deste, os isolados Cs-12, Cp-1, e Mc-3 causaram pouca redução no crescimento fúngico (tabela1).

Tabela 1. Compatibilidade “in vitro” entre *P. chlamydosporia* e rizobactérias em placas de Petri

Isolado	Antibiose sobre as bactérias	Antibiose sobre o fungo	Compostos voláteis Ø da colônia (cm)	Confrontação direta Ø colônia (cm)	
				BDA	523
Cs-12	-	-	3,6 ab	2,7 ab	2,5 b
Cp-6	-	+	1,9 e	1,9 def	1,0 d
Mc-4	-	+	2,2 de	1,7 ef	1,0 d
Cp-1	-	-	1,8 e	2,6 abc	2,4 b
Mp-7	-	+	1,8 e	2,3 bcd	1,3 cd
Cp-14	-	+	2,0 e	1,6 f	1,1 cd
Cp-13	-	+	2,5 cde	1,8 def	1,0 d
Cs-2	-	-	3,6 ab	2,9 a	2,9 a
Mc-3	-	-*	3,3 abc	2,6 abc	2,3 b
Cp	-	+	3,1 bcd	2,1 cde	1,3 c
Cp-5	-	+	2,0 e	2,2 cd	1,2 cd
Testemunha	-	-	4,0 a	2,8 a	2,8 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Sinal (-) ou (+) representam ausência ou presença de halo de crescimento, respectivamente.



**Figura 1.** Imagens dos testes de compatibilidade “in vitro” entre isolados bacterianos e o fungo *Pochonia chlamydosporia*. Teste de antibiose por difusão do fungo sobre bactérias (a – c); colônia fúngica crescida sobre membrana de diálise (a); placas com crescimento bacteriano, sem efeito de antibiose (b,c); teste de antibiose por difusão dos isolados bacterianos sobre *P. chlamydosporia* (d-f); placa com crescimento fúngico, sem efeito de antibiose (d); placa com efeito de antibiose (e); efeito baixo de antibiose (f); produção de compostos voláteis bacterianos (g-i); colônia da testemunha *P. chlamydosporia*, sem bactérias (g); colônia fúngica com baixo efeito de compostos voláteis (h); colônia fúngica reduzida, por efeito de compostos voláteis (i); experimento de antibiose por confrontação direta (j-l); testemunha, somente o fungo (j); placa sem efeito de antibiose (k); placa apresentando efeito de antibiose da bactéria sobre o fungo (l).

### *Interação entre P. chlamydosporia e rizobactérias no controle de M. javanica em tomate*

Nenhum dos tratamentos reduziu o número de galhas do nematoide em relação à testemunha. Quanto ao número de ovos, foi possível observar redução em relação à testemunha em alguns tratamentos. A combinação da bactéria Cs-2 com *Pochonia chlamydosporia* proporcionou redução de 31% e a combinação das três bactérias com *P. chlamydosporia* proporcionou redução de 37%. Quando se aumenta a quantidade de antagonistas, diversos mecanismos de ação contra os fitonematoides podem ocorrer. A aplicação de *P. chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* ou *Trichoderma harzianum* em conjunto com rizobactérias, é mais eficiente, que a utilização de qualquer antagonista isoladamente, no controle de *M. incognita* em tomate (Siddiqui & Akhtar, 2009). Resultados semelhantes ocorrem quando se combinam *Pochonia chlamydosporia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma viridae* para o controle de *Globodera* spp em batata (Muthulakshmi *et al.*, 2012). A existência de mais de um antagonista na área pode ser fundamental para a ocorrência de supressividade à fitonematoides (Stirling, 1991)

A microbiolização das sementes somente com o fungo *Pochonia chlamydosporia* não proporcionou redução no número de galhas e de ovos, entretanto, o sistema radicular das plantas microbiolizadas foi mais desenvolvido que em diversos tratamentos. A alta temperatura pode ter influenciado negativamente a atuação do fungo sobre os nematoides. A temperatura mais elevada provavelmente prejudicou o parasitismo dos ovos de *M. javanica* e resultou em menor eficiência de controle. Aparentemente, *P. chlamydosporia* desenvolve-se melhor em temperaturas mais brandas. Kerry *et al.* (1986), trabalhando com cinco isolados do fungo, observaram que o crescimento ótimo de três deles ocorria a 18 °C e, de dois isolados, de 20 a 25 °C. A colonização de massas de ovos é mais expressiva a 20 °C que a 25 e 30 °C e o maior controle, com redução da infectividade e multiplicação de nematoides ocorre a 25° C (De Leij, 1992). Como a temperatura de predação não é superior à de desenvolvimento de *P. chlamydosporia*, altas temperaturas podem reduzir a eficiência do fungo no solo. O maior desenvolvimento embrionário, multiplicação celular e eclosão dos J<sub>2</sub> de *M. javanica* ocorre a 28 °C (Campos *et al.*, 2008). Desta forma, havendo rápida taxa de eclosão, os

juvenis podem escapar da ação do fungo, ao passo que em temperaturas mais baixas, a eclosão é retardada, o que possibilita maior exposição dos ovos ao fungo.

Além disso, neste caso o fungo foi aplicado via microbiolização de sementes. Talvez a baixa quantidade de clamidósporos aplicada junto à semente, não seja suficiente para exercer controle efetivo já no primeiro ciclo da cultura. Bourne & Kerry (1999), aplicaram 5.000, 10.000, ou 50.000 clamidósporos/g de solo, e observaram maior colonização da rizosfera de várias espécies de plantas, com maior concentração de inóculo, e maior controle de nematoides com o aumento do inóculo fúngico em plantas de couve e feijão. A aplicação de 10.000 clamidósporos/g de solo resultou em 41% a mais de controle do que 5.000 clamidósporos/g de solo infestado com *M. javanica* (Podestá *et al.*, 2009). Como *P. chlamydosporia* se desenvolve em matéria orgânica, coloniza endofiticamente o sistema radicular de diversas plantas e atua parasitando ovos e fêmeas de fitonematoides Manzanilla-Lopez *et al.* (2013), sua população poderá aumentar e com isso, aumentar a eficiência de controle nos ciclos subsequentes da cultura.

Tabela 2. Efeito da interação entre *P. chlamydosporia* e rizobactérias aplicados via microbiolização de sementes no número de galhas, ovos e massa radicular de plantas de tomate inoculadas com 4000 ovos de *Meloidogyne javanica*

Tratamentos	Galhas		Ovos		Massa da raiz	
	Nº	Redução (%)	Nº	Redução (%)	(g)	Aumento (%)
Testemunha	470 <sup>ns</sup>	-	804583 ab	-	20,4 abc	-
Cp-5	402	-	792330 ab	2	20,0 abc	-2
Cs-2	466	-	879853 a	-9	21,5 ab	5
Mc-3	454	-	618053 bcd	23	19,2 bc	-6
3 Bac	429	-	720207 abcd	10	19,5 bc	-5
Pc-10	418	-	764097 abc	5	24,6 a	21
Cp-5 +Pc-10	400	-	611893 bcd	24	19,9 bc	-3
Cs-2 +Pc-10	482	-	551320 cd	31	18,4 bc	-10
Mc-3 +Pc-10	444	-	725083 abcd	10	15,9 c	-22
3 Bac + Pc-10	445	-	506660 d	37	19,0 bc	-7

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### *Aplicação de Mc-3 e Pc-10 via irrigação no controle de Meloidogyne javanica em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação*

O número de galhas de *M. javanica* foi reduzido em 33 e 30% em relação à testemunha, onde se aplicaram somente o isolado Pc-10 e na interação Mc-3 + Pc-10 respectivamente. Já quanto ao número de ovos as reduções foram de 64, 60 e 49% quando o solo foi tratado com Mc-3, Pc-10 e na interação de ambos, respectivamente. Além disso, quando os antagonistas foram utilizados em conjunto, as plantas apresentaram 16% de aumento no peso (tabela 3). Diversos fatores podem ter favorecido a atuação dos antagonistas neste teste. Diferentemente do teste anterior, este foi conduzido durante o Outono, com temperaturas mais brandas, favorecendo o fungo, que se desenvolve melhor e exerce maior controle sobre os fitonematoides (Kerry *et al.*, 1986; De Leij, 1992). Além disso, nestas condições o desenvolvimento embrionário dos ovos é retardado (Campos *et al.*, 2008). Com isto, os antagonistas podem atuar sobre os ovos por maior tempo, antes que os juvenis eclodam. A maior concentração de inóculo fúngico e bacteriano provavelmente favoreceu a atuação dos antagonistas. Pois, diferentemente do teste anterior, onde os organismos foram introduzidos via microbiolização de sementes, neste caso aplicaram-se 5000 clamidósporos/ g de solo e 40 mL de suspensão bacteriana.

Não houve efeito sinérgico, nem tão pouco aditivo, na combinação dos antagonistas, sobre os ovos e galhas do nematoide, entretanto, o peso das plantas foi 16% superior que no tratamento testemunha. Nem sempre, a interação de antagonistas proporciona incremento no efeito de controle biológico, como observado por Roberts *et al.*, (2005), onde não se obteve redução na infecção causada por *M. incognita* em melão.

Tabela 3. Efeito da interação entre *P. chlamydosporia* e do isolado Mc-3 aplicados via irrigação do solo, no número de galhas, ovos e massa das plantas de tomate inoculadas com 3000 ovos de *Meloidogyne javanica*

Tratamentos	Galhas		Ovos		Massa da planta	
	Nº	Redução (%)	Nº	Redução (%)	(g)	Aumento (%)
Testemunha	766 a	-	498507 a	-	55 b	-
Mc-3	650 ab	15	180544 b	64	60 ab	10
Pc-10	511 b	33	198640 b	60	55 b	0
Mc-3 + Pc-10	539 b	30	254107 b	49	63 a	16

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No semeio do solo em meio 523, observou-se que nos experimentos onde havia sido aplicado o isolado Mc-3, a população bacteriana era alta, diferentemente dos tratamentos sem bactérias (Figura 2A). Da mesma forma, ocorreu com o semeio no meio semi-seletivo para *P. chlamydosporia* (Figura 2B). Já se observou população de *P. chlamydosporia* e colonização de ovos de *M. javanica* nove meses após a aplicação do fungo no solo, em cultivos subsequentes de tomate e alface (Verdejo-Lucas *et al.* 2003). Portanto, os organismos permaneceram viáveis até o fim do experimento, ambos sendo recuperados em quantidades altas, inclusive, quando aplicados em conjunto. O que mostra que a sobrevivência destes organismos não foi afetada pela presença de outro antagonista.

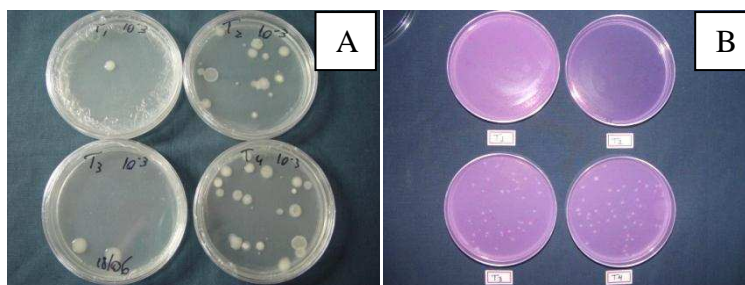


Figura 2. Imagem de placas de Petri, contendo colônias bacterianas (A), crescidas em meio de cultura 523 de Kado e Heskett por 24 h a 28 °C e colônias fúngicas (B), crescidas em meio semi-seletivo Gaspard por 7 dias a 25 °C.

## Conclusão

A interação de *Pochonia chlamydoasporia* com Cs-2 e com a combinação das três bactérias testadas, aplicados via microbiolização de sementes é promissora para o controle biológico do nematoide das galhas, reunindo diferentes mecanismos de ação contra estes patógenos. Apesar de não incrementar o efeito de controle exercido por *P. chlamydoasporia*, a bactéria Mc-3 (*Bacillus* sp.) é eficiente no controle biológico de *M. javanica*, quando aplicada via irrigação do solo.

## Referências:

- ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBECH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C.; *et al.* 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Natural Biotechnology*, 26: 909–915.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6: 553 (Suplemento).
- BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. 1999. Effect of the plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 75-84.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. & POZZA, E.A. 2008. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica*, 34: 29-33.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathology. St. Paul. APS. 539 p.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. & FABRY, C.F.S. 2006. *Pochonia chlamydoasporia* como

promotor de crescimento de plântulas de tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIX, Salvador. Resumos, p.191.

DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. & DENNEHY J.A. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 38: 112-122.

DUBE, B. & SMART JR, G.C. 1987. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 19: 222-227.

FABRI, C.F.S. 2006. Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias. 63p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Editora UFV, Viçosa. 304 p.

FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S. & FREITAS, L.G. 2012. Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN, L.; JESUS JR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, p. 203-222.

FREITAS, L.G., DALEMOLLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; PODESTÁ, G.S. & FERRAZ, S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. In: ZAMBOLIM, L. & M.C. PIKANÇO. (ed). Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos. Editora UFV, Viçosa, p. 41-82.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2012. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L., JESUS JUNIOR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128.

GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A. & FERRIS, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. 1990. *Journal of Nematology*, 22: 207-213.

GINÉ, A.; BONMATÍ, M.; SARRO, A.; STCHIEGEL, A.; VALERO, J.; ORNAT, C.; FERNÁNDEZ, C. & SORRIBAS, F.J. 2013. Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *Biological Control*, 58: 407-416.

HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN A.; RODRIGUEZ-KÁBANA R. & KLOEPPER J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 925-937.

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

KADO, C.I & HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60: 969-979.

KERRY, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 22: 621-631.

KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes – a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47: 69-75.

KERRY, B.R.; IRVING, F. & HORNSEY, J.C. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. I. Factors affecting growth in vitro. *Nematologica*, 32: 461-473.

KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MCINROY, J.A. & COLLINS, D.J. 1991. Analyses of populations and physiological characterization of microorganisms. *Plant and Soil*, 136: 95-102.

KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICS, R.M.; TIPPING, E.M. & LIFSHITZ, R. 1990. Plant growth-promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L. & CREGAN, P.B. (ed). *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.315-326.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, O.D.; GARDIANO, C.G. & CARVALHO, S.L. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 31: 78-84.

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M.M.; HIRSCH, P.R.; WARD, E.; DEVONSHIRE, J. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 45: 1-7.

MARCIÁ-VICENTE, J.G.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; JANSON, H.B. & LOPEZ-LLORCA, L.V. 2009. Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, 155: 391-401.

MONTEIRO, T.A. 2014. Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. 63p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F. & RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13: 245-260.

MUKHTAR, T. & PERVAZ, I. 2003. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 5: 576-579.

MUNIF, A.; HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. 2013. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. *Journal ISSAAS*, 2: 68-74.

MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, S. & ANITA, B. 2012. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. *Journal of Biopesticide*, 5: 243-245.

OOSTENDORP, M. & SIKORA, R. 1990. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Revue de Nematologie*, 13: 269-274.

PERRY, R.N.; MOENS, M. & STARR, J.L. 2009. Root-knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK and Cambridge, USA. 488 p.

PINHO, R.S.C.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M.; SILVA, J.R.C.; OLIVEIRA, M.S.; PIMENTEL, G.C.S. & COSTA, L.S.A.S. 2009. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 33: 54-60.

PODESTÁ, G.S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. & ZOOCA, R.J.F. 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 33: 191-193.

RIBEIRO, R.C.F.; CAMPOS, V.P.; XAVIER, A.A.; ROCHA, L.S.; SOUZA, H.B.; AGUIAR, F.M.; SOUZA, R.M.; MIZOBUTSI, E.H. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2012. Control of *Meloidogyne javanica* and Panama disease with rhizobacteria. *Nematropica*, 42: 218-226.

ROBERTS, D.P.; LOHRKE, S.M.; MEYER, S.L.F.; BUYER, J.S.; BOWERS, J.H.; BAKER, C.J.; LI, W.; SOUZA, J.T.; LEWIS, J.A. & CHUNG, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection*, 24: 141-155.

SASSER, J.N. & FRECKMAN, D.W. 1987. A world perspective on nematology: The role of the society. In: VEECH, J. & DICKSON, D.W. (ed). *Vistas on Nematology: A commemoration of the twenty-fifth anniversary of the society of nematologists*. Hyatsville, Maryland. p. 7-14.

SIDDIQUI, Z.A. & AKHTAR, M.S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Australasian Plant Pathology*, 38: 22-28.

SIDDIQUI, I.A. & EHTESHAMUL-HAQUE, S. 2000. Effect of *Verticillium chlamydosporium* and *Pseudomonas aeruginosa* in the control of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematologia Mediterranea*, 28: 193-196.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal Phytopathology*, 151: 215-222.

SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*, 152: 48-54.

STIRLING, G.R. 1991. *Biological control of plant-parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects*. Wallingford, U.K: CAB International. 282 p.

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

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F.J.; ORNAT, C. & GALEANO, M. 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology*, 52: 521-528.

# Meio de Cultura Sólido para a Produção de Bionematicida à Base de *Bacillus* sp.

Guilherme Silva de Podestá<sup>1\*</sup>, Leandro Grassi de Freitas<sup>1</sup>, Dayana Carvalho

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000 Viçosa (MG), Brasil. \*Corresponding author: [guilherme.podesta@ufv.br](mailto:guilherme.podesta@ufv.br)

Artigo – Normas Nematropica

## Resumo

Objetivou-se neste trabalho, desenvolver um meio de cultivo sólido para a produção de esporos do isolado Mc-3 de *Bacillus* sp.. A aplicação de 100 mL de água nos sacos contendo 300 g de arroz, autoclavagem, seguida da aplicação de suspensão bacteriana e incubação por 5 dias a 30 °C é eficiente em produzir esporos do isolado Mc-3, gerando em média  $1 \times 10^9$  esporos por grama de arroz. A adição de meios de cultura líquidos à suspensão bacteriana pós autoclavagem não resultou em aumento da produção. Já a aplicação de doses crescentes de farelo de soja ao arroz, mostrou que a aplicação de 20 g por saco, proporciona aumento da produção de esporos de Mc-3. Quando cultivado em meio líquido 523 de Kado e Heskett, a produção de esporos é bem inferior, por volta de  $6 \times 10^6$  esporos/mL. O cultivo de Mc-3 em meio sólido à base de arroz é eficiente, proporcionando grande quantidade de esporos.

## Introdução

Os fitonematoides são patógenos extremamente importantes e de difícil manejo. São responsáveis por perdas na agricultura, que vão desde desvalorização das terras, redução na produtividade até perda total da cultura e impossibilidade de cultivo de determinada espécie vegetal na área (Tihohod, 1993; Ferraz *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2012). Em geral existem problemas associados às medidas de manejo mais conhecidas, o controle químico e o plantio de variedades resistentes. A integração destes métodos, com outros menos praticados, como rotação de culturas, adição de matéria orgânica e o

controle biológico é uma alternativa para se aumentar a eficiência do manejo, reduzindo danos ambientais.

Neste contexto, a produção dos organismos antagonistas em larga escala se torna uma necessidade. Uma vez realizados testes de eficiência contra o patógeno alvo, e encontrados os possíveis agentes de controle biológico, faz-se necessário desenvolver um meio de cultura eficiente e barato para a multiplicação destes organismos. São basicamente duas metodologias utilizadas para a multiplicação de microrganismos, conhecidas como fermentação em substrato líquido e fermentação em substrato sólido. Na primeira, o organismo é cultivado submerso no meio de cultivo, enquanto na segunda, é cultivado em substrato sólido, e a umidade vai variar com o tipo de organismo produzido.

A fermentação em substrato sólido apresenta uma série de vantagens, como alta produção, aumento da estabilidade dos produtos, baixos custos de produção, baixo gasto de água, menor taxa de contaminação entre outros (Holker & Lenz, 2005). Tanto que esta metodologia tem ganhado espaço nas indústrias biotecnológicas nos últimos anos. Com aplicação na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, alimentos, combustíveis, produtos farmacêuticos, agrícolas, entre outros (Singhania *et al.*, 2009).

Espécies de *Bacillus* são mundialmente utilizadas como agentes de controle biológico de insetos e fitopatógenos. O fato de produzirem esporos de resistência sob condições adversas Dawar *et al.* (2010), pode representar uma vantagem sobre outras rizobactérias, quando se pensa em utilização como produto de controle biológico, permitindo maior vida útil do organismo. Infelizmente, muitas informações com relação à multiplicação e esporulação destes organismos são segredos industriais. A otimização do processo de fermentação em estado sólido, poderá contribuir para o aumento do uso destes organismos também no controle biológico de nematoides. Na literatura, encontram-se diversos trabalhos onde os autores testaram meios de cultivo sólidos para a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* (El-Bendary, 2006; Silva, 2007; Shojaaddini *et al.*, 2010; Marzban, 2012;). Esta espécie vem sendo extensivamente utilizada para o manejo de insetos em grandes plantações, e já foi relatada exercendo controle sobre fitonematoides (Khyami-Horani & Al-Banna, 2006; Berlitz *et al.*, 2013). Por isso, estes trabalhos irão

nortear a condução dos experimentos. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi encontrar um meio de cultura sólido eficiente na multiplicação do isolado Mc-3 (*Bacillus* sp.).

### **Material e Métodos**

O isolado Mc-3 de *Bacillus* sp., utilizado nos experimentos pertence à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, Departamento de Fitopatologia-UFV, foi obtido em raízes de mucuna cinza (*Mucuna pruriens* var *utilis*) e possui potencial como agente de controle biológico de fitonematoides.

O primeiro experimento foi conduzido para se avaliar a interferência da dose de água pré autoclavagem e do tempo de incubação sobre a produção de esporos de Mc-3. Em sacos autoclaváveis de polipropileno, contendo 300g de arroz quebrado (tipo 3) adicionaram-se 50 ou 100 mL de água destilada. Após a selagem dos sacos, estes foram esterilizados em autoclave por 30 minutos. Então, uma suspensão contendo 40 mL de Mc-3 crescido em meio líquido 523 de Kado e Heskett (1970) por 24 horas a 30 °C, e 80 mL de água, foi injetada em cada saco. O volume de líquido aplicado no arroz foi determinado em estudos anteriores (Capalbo *et al.*, 2001). Estes ficaram incubados a 30 °C por 4 ou 5 dias, dependendo do tratamento. Após este período, o arroz foi retirado dos sacos, seco em bandejas plásticas por 12 horas a 50 °C e moído. Uma alíquota de 1 g foi diluída em 10 mL de solução salina (0,85%) e foi aquecida a 80 °C por 15 minutos para a morte das células vegetativas (Zhao *et al.*, 2008). Após diluições em série, realizou-se o semeio em placas de Petri contendo meio 523 sólido e estas foram incubadas a 30°C por 24 horas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial com quatro repetições por tratamento. A avaliação consistiu da contagem das colônias crescidas nas placas.

O segundo experimento foi conduzido para avaliar se a incorporação de nutrientes juntamente com a bactéria crescida em meio líquido, proporcionaria maior produção de esporos. Sacos de polipropileno contendo 300 g de arroz quebrado e 100 mL de água foram autoclavados e, em seguida, injetaram-se em cada saco, 50 mL de Mc-3 crescida em meio líquido 523 a 150 rpm por 24 horas a 30 °C, mais 70 mL de água, meio líquido 523 ou meio nutriente

contendo em cada litro: glicose de milho (7,5 g), extrato de levedura (2,5 g), FeSO<sub>4</sub> (0,02 g), ZnSO<sub>4</sub> (0,02 g), MnSO<sub>4</sub>, (0,02 g) e MgSO<sub>4</sub> (0,3 g) (Mendonça *et al.*, 2011). Os sacos ficaram incubados a 30 °C por 5 dias, quando procedeu-se a avaliação, seguindo a mesma metodologia do primeiro ensaio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

O terceiro experimento foi conduzido para avaliar se a adição de farelo de soja ao arroz poderia gerar aumento na produção de esporos. Neste caso, além do arroz e água, adicionou-se 0, 10, 20, 30, 40 ou 50 g de farelo de soja antes da autoclavagem. Em seguida, injetaram-se em cada saco, 50 mL de Mc-3 crescida em meio líquido 523 por 24 horas a 30 °C, e 70 mL de água. A condução e avaliação do experimento seguem o mesmo esquema dos testes anteriores.

Para efeito de comparação, o isolado Mc-3 (*Bacillus* sp.) foi crescido em meio líquido 523 a 150 rpm por 5 dias. Após este período, uma alíquota foi aquecida a 80°C por 15 minutos para a morte das células vegetativas (Zhao *et al.*, 2008). Outra alíquota foi coletada e não passou pelo aquecimento. Após diluições em série, realizou-se o semeio em meio 523 sólido e incubação a 30°C por 24 horas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e a avaliação consistiu da contagem do número de colônias crescidas nas placas.

## **Resultados e Discussão**

Na avaliação da dose de água em pré-autoclavagem e do tempo de incubação sobre a produção de esporos do isolado Mc-3, observou-se que não houve interação entre os tratamentos. A dose de 100 mL proporcionou produção de esporos 4,5 vezes maior que na dose inferior (tabela 1). Além disso, a incubação por 5 dias foi mais eficiente, proporcionando produção de esporos 3,3 vezes maior que na incubação por 4 dias (tabela 1).

Tabela 1. Efeito da dose de água em pré-autoclavagem e do tempo de incubação dos sacos de arroz na produção de esporos de Mc-3, através da avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett

Dose de H <sub>2</sub> O	*UFC/g		
	4 dias	5 dias	Médias
50 mL	4,5 x 10 <sup>8</sup>	6,8 x 10 <sup>8</sup>	5,6 x 10 <sup>8</sup> a
100 mL	8,8 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>	1,1 x 10 <sup>9</sup> b
Médias	6,6 x 10 <sup>8</sup> a	9,9 x 10 <sup>8</sup> b	

\* = Unidades formadoras de colônia por grama de arroz moído

Média seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Na avaliação da incorporação de nutrientes ao arroz, não foi observada diferença entre os tratamentos (tabela 2). Possivelmente, a quantidade de nutrientes fornecida pela suspensão bacteriana seja suficiente para o crescimento da bactéria no substrato sólido à base de arroz.

Tabela 2. Efeito do aporte de nutrientes pós-autoclavagem, na produção de esporos de Mc-3 em substrato sólido à base de arroz, através da avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri contendo meio 523 de Kado e Heskett

Tratamentos	*UFC/g
Mc-3 + H <sub>2</sub> O	1,07 x 10 <sup>9</sup> ns
Mc-3 + 523	9,67 x 10 <sup>8</sup>
Mc-3 + Meio nutriente	9,17 x 10 <sup>8</sup>

ns = não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

\* = Unidades formadoras de colônia por grama de arroz moído

Quanto ao efeito da adição de doses crescentes de farelo de soja ao arroz, observou-se que a produção de esporos aumenta até 20g por saquinho, passando a decrescer com o aumento da dose (Figura 1). Diversos autores utilizam o farelo de soja na composição de seus meios de cultivo, para a

produção de esporos bacterianos (Valicente & Mourão 2008; Angelo et al., 2010; Mendonça et al., 2011). Os resultados do presente trabalho confirmam a importância deste produto no crescimento e esporulação de *Bacillus* sp. Neste teste, a média da produção de esporos foi inferior à obtida nos testes anteriores. Isto provavelmente se deu pela troca da incubadora utilizada. Provavelmente, o ambiente foi um pouco diferente nos dois equipamentos. Holker & Lenz (2005), comentam em seu trabalho sobre a dificuldade de padronizar a produção de esporos no cultivo em meio sólido, principalmente no sistema estático. Portanto, pequenas variações no ambiente poderão resultar em grande redução da produtividade.

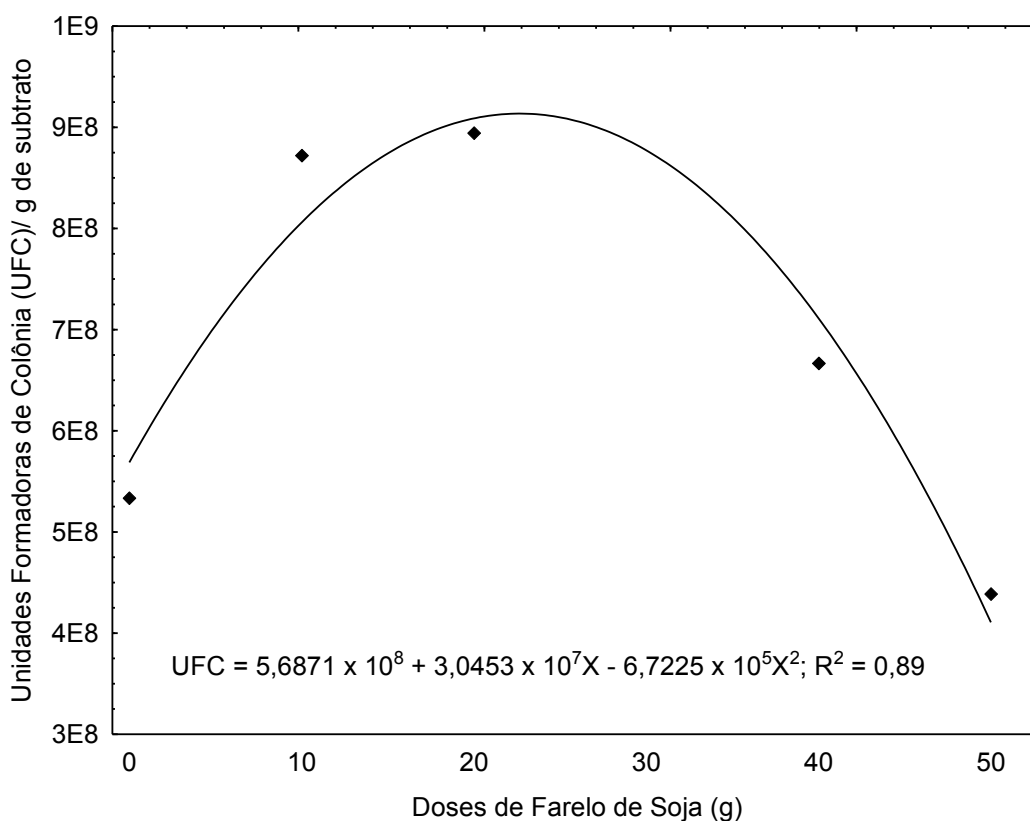


Figura 1 – Número de unidades formadoras de colônia (UFC)/g de substrato, com a aplicação de diferentes doses de farelo de soja.

No teste conduzido para avaliar a produção de esporos em meio líquido 523, observou-se que, quando as amostras foram aquecidas a 80 °C para a morte das células vegetativas, houve produção média de  $6,05 \times 10^6$  UFC/mL. Já sem o aquecimento, foram encontradas  $1,86 \times 10^7$  UFC/mL. Logo,

aproximadamente 1/3 das células bacterianas produzidas no meio são esporos. Como no meio sólido com somente arroz, produz-se ao menos  $5 \times 10^8$  esporos/g, cada saquinho produz  $1,5 \times 10^{11}$  esporos. Ao compararmos o custo dos ingredientes de cada meio de cultivo, verificamos que para se produzir  $1,5 \times 10^{11}$  esporos no meio líquido 523, são gastos em média dez vezes mais que no meio de cultivo sólido.

### Conclusões

É possível produzir esporos do isolado Mc-3 (*Bacillus* sp.) em meio de cultivo sólido à base de arroz evitando-se alguns problemas que ocorrem na fermentação líquida, como menor produtividade e alto consumo de água. Entretanto, novos testes devem ser realizados a fim de se aumentar a eficiência produtiva do processo.

### Referências:

- ANGELO, E.A.; VILAS-BÔAS, G.T. & CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. 2010. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. Semina: Ciências Agrárias, 31: 945-958.
- BERLITZ, D.L.; SAUL, D.A.; MACHADO, V.; SANTIN, R.C.; GUIMARÃES, A.M.; MATSUMURA, A.T.S.; RIBEIRO, B.M. & FIUZA, L.M. 2013. *Bacillus thuringiensis*: molecular characterization, ultrastructural and nematotoxicity to *Meloidogyne* sp.. Journal of Biopesticide, 6: 120-128.
- CAPALBO, D.M.F.; VALICENTE, F.H. MORAES, I.O. & PELIZER, L.H. 2001. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. Electronic Journal of Biotechnology, 4: 112-115.
- DAWAR, S.; WAHAB, S.; TARIQ, M. & ZAKI, M.J. 2010. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43: 412-418.
- EL-BENDARY, M.A. 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology, 46: 158-170.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Editora UFV, Viçosa. 304 p.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2012. Nematoides como patógenos de plantas. In: ZAMBOLIN, L., JESUS JUNIOR, W.C. & PEREIRA, O.L. (ed). O essencial da fitopatologia. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128.

HÖLKER, U. & LENZ, J. 2005. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301-306.

KADO, C.I & HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60: 969-979.

KHYAMI-HORANI, H. & AL-BANNA, L. 2006. Efficacy of *Bacillus thuringiensis jordanica* against *Meloidogyne javanica* infecting tomato. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 153-157.

MARZBAN, R. 2012 Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biopesticide*, 5: 144-147.

MENDONÇA, R.S.; BARROS, E.C.; MOURÃO, H.C.M.; SOUZA, C.S.F.; TORRES, A.A.G.; SILVA, C.G.M.; BOREGAS, K.G.B.; SILVA, R.B.; RODRIGUES, T.B. & VALICENTE, F.H. 2011. Meio de cultura alternativo para *Bacillus thuringiensis*. In: 12º SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico, Resumos, p. 232.

SHOJAADDINI, M.; MOHARRAMIPOUR, S. KHODABANDEH, M. & TALEBI, A.A. 2010. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. *Journal of Plant Protection Research*, 50: 9-14.

SILVA, M. 2007. Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. 129p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R. & PANDEY, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.

TIHOHOD, D. 1993. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal, SP: Funep. 372 p.

VALICENTE, F.H. & MOURÃO, A.H.C. 2008. Use of By-Products Rich in Carbon and Nitrogen as a Nutrient Source to Produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-Based Biopesticide. *Neotropical Entomology*, 376: 702-708.

ZHAO, S.; HU, N.; HUANG, J.; LIANG, Y. & ZHAO, B. 2008. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnology Letter*, 30: 295-297.

## CONCLUSÕES GERAIS

A Combinação de agentes de controle biológico com matéria orgânica, como condicionadores de solo, é uma boa alternativa para o manejo do nematoide das galhas. O uso simultâneo da *Gracilibacillus dipsosauri* (isolado MIC 14), *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-12) e do condicionador de solo Ribumin<sup>®</sup>, apresenta um efeito positivo na redução da população do nematoide de galhas *Meloidogyne javanica*.

No sistema radicular de plantas antagonistas a nematoides, encontram-se bactérias promissoras para o manejo do nematoide das galhas. Os isolados Cs-2 (*Enterobacter* sp.), Cp-5 (*Bacillus subtilis*) e Mc-3 (*Bacillus* sp.) são eficientes quando aplicados via irrigação do solo, principalmente por retardar o ciclo do nematoide. Além disso, o isolado Mc-3 é eficiente também quando aplicado via microbiolização de sementes, reduzindo grandemente a multiplicação do nematoide no interior das raízes.

A combinação de antagonistas é uma boa alternativa para o manejo de fitonematoides. A interação de *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc-10) com Cs-2 (*Enterobacter* sp.) e com a combinação dos isolados Cs-2 (*Enterobacter* sp.), Cp-5 (*Bacillus subtilis*) e Mc-3 (*Bacillus* sp.), aplicados via microbiolização de sementes é eficiente no manejo do nematoide das galhas. Apesar de não incrementar o efeito de controle exercido por *P. chlamydosporia*, a bactéria Mc-3 (*Bacillus* sp.) também é eficiente no manejo de *M. javanica*, quando aplicada via irrigação do solo.

A fermentação em estado sólido utilizando-se arroz como substrato é eficiente na produção de esporos do isolado Mc-3 (*Bacillus* sp.), apresentando menor gasto de água, menor custo e maior produtividade que o cultivo em meio de cultura líquido.