

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e folhelhos
pirobetuminosos no controle de *Meloidogyne incognita* em *Ficus carica* cv.
Roxo de Valinhos**

Caroline Neugebauer Wille

Pelotas, 2013

CAROLINE NEUGEBAUER WILLE

**Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e folhelhos
pirobetuminosos no controle de *Meloidogyne incognita* em *Ficus carica* cv.
Roxo de Valinhos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fitossanidade da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Fitossanidade.

Orientador: Cesar Bauer Gomes

Coorientadora: Andréa Bitencourtt Moura

Pelotas, 2013

Banca examinadora:

Dr. Cesar Bauer Gomes

Dr. Leandro José Dallagnol

Dr. José Soares do Nascimento

Dra. Juliane Ludwig

Dra. Stela Maris Kulkzunski

Dra. Gláucia Figueiredo Nachtigal

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas que me acolhe desde 2003 quando iniciei a graduação em Ciências Biológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, área de concentração Fitopatologia, pela oportunidade concedida e apoio.

À Embrapa Clima Temperado, pelo espaço, recursos concedidos e por todos profissionais que de alguma forma colaboraram para realização dos experimentos.

Ao Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Camaquã pelo incansável apoio e pela confiança que depositaram no meu trabalho.

Ao projeto Xisto Agrícola pelos recursos concedidos para realização dos experimentos.

Ao meu orientador, Dr. Cesar Bauer Gomes, obrigada por compreender os caminhos que escolhi, por confiar nas minhas capacidades e ter uma incansável paciência para perdoar meus erros, pelo respeito, incentivo, colaboração e auxílio constante, pela disponibilidade até mesmo nos feriados e fins de semana, pelos conselhos, pelo entusiasmo a cada resultado avaliado, mas acima de tudo pela amizade e fé de que tudo daria certo.

À professora Andréa Bittencourt Moura, pela co-orientação, pelos conhecimentos compartilhados e pelos conselhos valiosos.

Às estagiárias Aline Tietz, Chaiane Signorini, Daniele de Brum e Fernanda Cruz que me ajudaram na execução de diferentes etapas desse projeto, pela incansável dedicação, competência e amizade.

Aos colegas da Embrapa Lúcia Somavilla, Israel Lima Medina, Victor Hugo Casa Coila, Josiane Casarin e Jaqueline Tavares Schafer, que colaboraram na execução do projeto, obrigada pelo tempo cedido, conhecimentos compartilhados, conselhos, solidariedade e amizade.

Aos funcionários do Laboratório Fitopatologia da Embrapa, Gelson e Claudiomar pela ajuda nas coletas e análises.

A amiga Monalize Motta pelo apoio na identificação molecular dos isolados, pela energia positiva e paciência.

A amiga Elizandra Minotto por compartilhar seus conhecimentos e conselhos.

A Ana Geller, Cátia Barcelos e Luciana Machado, como representantes da direção do IFSul campus Camaquã pela flexibilidade, riscos assumidos, confiança e amizade.

À amiga Carla Vianna pelas dicas de sobrevivência em tempos de tese.

Ao meu amado Vagner Euzébio Bastos, estagiário e motorista nas horas vagas, pela compreensão, ajuda, carinho e oração.

Aos meus pais pela confiança, incentivo, amor, paciência e todas as caronas até a Embrapa.

Aos pesquisadores que compõem a banca examinadora pela disponibilidade e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Deus que colocou essas instituições e pessoas no meu caminho oportunizando que eu realiza-se esse trabalho e ainda me deu forças para fazê-lo.

A todos colegas do IFSul que me ajudaram com palavras de consolo, substituições e conselhos, especialmente aos amigos Luciana Machado, Guilherme Schirmer, Michele Machado, Lydia Mulling, Carla Vianna, Fabrício Dutra e Cátia Barcelos.

A todos os colegas da Fitossanidade pelos momentos de aprendizado, pelas alegrias e frustrações compartilhadas.

Aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e me suportaram nos momentos difíceis.

Muito Obrigada!!!!

RESUMO

WILLE, Caroline Neugebauer. **Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e folhelhos pirobetuminosos no controle de *Meloidogyne incognita* em *Ficus carica* cv. Roxo de Valinhos**. 2013. 108f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A figueira (*Ficus carica* L.) é uma frutífera cultivada em todo mundo devido a sua capacidade de adaptação climática; sendo essa economicamente importante para o Brasil e para o Rio Grande do Sul no contexto da agricultura familiar. No entanto, pragas como o nematoide das galhas (NG) *Meloidogyne incognita* afetam seriamente a produção considerando a elevada agressividade do parasita e a falta de tecnologias de manejo efetivas para o controle dessa praga. Nesse contexto, o manejo fitossanitário de pomares de figueira infestados por esse nematoide é indispensável para a cultura seja viável economicamente. Assim, a inserção do controle biológico no manejo integrado de *M. incognita* constitui-se como uma estratégia importante. Entre os biocontroladores, as rizobactérias são bactérias competentes da rizosfera por promover o crescimento vegetal e ou inibir a ação parasítica dos fitonematoides sobre as plantas hospedeiras. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram: 1) Isolar bactérias com potencial para o biocontrole de *M. incognita* a partir de raízes de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos; 2) Caracterizar os isolados mais promissores através de testes bioquímicos e sequenciamento de DNA; 3) Avaliar o desempenho dos isolados bacterianos selecionados, no biocontrole de *M. incognita* em figueira cultivada em solo naturalmente infestado, sob duas formas de aplicação; e, 4) Avaliar a influência dos tratamentos bacterianos na nematofauna habitante do solo. Inicialmente, os isolados obtidos de folhelhos pirobetuminosos e de raízes de figueira foram avaliados em ensaios *in vitro* quanto ao efeito sobre ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, e, à produção de compostos relacionados ao controle biológico de nematoides. Quatorze bactérias produziram pelo menos um composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides (protease em gelatina e leite de Litmus, lipase, quitinase e ou amônia), e resultaram em altos níveis de mortalidade (78-100%) ou inibição da eclosão (73-100%) dos juvenis de segundo estágio do nematoide. Estes isolados foram selecionadas e caracterizadas através de provas bioquímicas e sequenciamento de DNA, sendo, a seguir, avaliadas quanto ao biocontrole do NG e promoção de crescimento de figueiras em dois ensaios conduzidos em casa de vegetação sob diferentes formas de aplicação dos antagonistas. No primeiro ensaio, raízes de mudas de figueira 'Roxo de Valinhos' foram microbiolizadas com as 14 bactérias selecionadas, separadamente; e, 30 dias

após, cada planta foi transplantada individualmente para vasos com solo naturalmente infestado com *M. incognita*. Embora o nematoide das galhas tenha afetado o desenvolvimento das figueiras em todos os tratamentos, os isolados F25 (*Bacillus* sp.), F78 (*Streptomyces* sp.), F76 (*Streptomyces* sp.), FB59 (*Pseudomonas denitrificans*) e FB34 (*Arthrobacter oxydans*) reduziram significativamente o fator de reprodução do nematoide das galhas ($P < 0,05$) em 49, 46, 39, 28 e 26%, respectivamente, em relação à testemunha inoculada e não microbiolizada. No segundo experimento, duas bactérias mais promissoras quanto ao potencial biocontrolador de *M. incognita in vitro* (F75 e F78), foram avaliadas quanto à capacidade de supressão do nematoide e sobre o desenvolvimento das figueiras, pelo tratamento do solo com as respectivas suspensões bacterianas, 48h antes do plantio das mudas. Nesse experimento, os isolados suprimiram a reprodução de *M. incognita* a uma taxa de 21 a 43%. Além do mais, proporcionaram maior peso da massa seca de folhas, níveis mais elevados fenóis e fósforo no solo em relação à testemunha mantida em solo infestado e não microbiolizada. Contudo, a condução de trabalhos adicionais nesse patossistema possibilitaria a melhor compreensão dos mecanismos de atuação das bactérias testadas sobre a figueira e a inserção da técnica em um programa de manejo integrado do nematoide das galhas.

Palavras-chave: controle biológico, rizobactérias, nematoide das galhas, figueira, biocaracterização.

ABSTRACT

WILLE, Caroline Neugebauer. **Potential of bacterial isolated from the roots of fig and pirobetuminoso shales in the control of *Meloidogyne incognita* in *Ficus carica* cv. Roxo de Valinhos**. 2013. 108f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The fig tree (*Ficus carica* L.) is a fruitfull grown throughout the world due to its ability to climate adaptation; being important economically to Brazil and Rio Grande do Sul State in the family farming context. However, pests such as the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* seriously affect the fruit production considering the high aggressiveness of this nematode and the lack of effective management technologies for control of this pest. In this context, the phytosanitary management in infested fig orchards by this nematode is essential to allow the economic viability for this fruit crop. Thereby, the introduction of biological control in the *M. incognita* integrated management is an important strategy. Among biocontrol agents, the rhizobacteria are good rhizosphere competent bacteria for promoting plant growth and or inhibiting the action of parasitic nematodes on host plants. Therefore, the objectives of this study were: 1) To isolate bacteria with potential for biocontrol of *M. incognita* from the fig tree roots and pirobetuminoso shale rocks; 2) to characterize the most promising isolates through biochemical tests and DNA sequencing; 3) to evaluate the performance of selected bacterial isolates in the biocontrol of *M. incognita* on fig tree growing in naturally infested soil under two application forms of the microorganisms; and 4) to evaluate the effect of treatments on bacterial inhabitant nematofauna soil. Firstly, the bacterial isolates obtained from the pirobetuminoso shales and from the fig roots were evaluated on the hatching and mortality of *M. incognita* second-stage juveniles in *in vitro* tests besides the production of related compounds to biological control of nematodes. Fourteen bacterial isolates produced at least one compound related to the biocontrol of plant parasitic nematodes (protease Litmus milk and gelatin, lipase, chitinase and or ammonia), and high levels of mortality (78-100 %) or inhibition of hatching (73-100 %) of second stage juveniles of the nematode. Subsequently, these bacterial isolates were selected, characterized via biochemical tests and DNA sequencing, and then they were evaluated for their potential for the RKN biocontrol and fig growth promotion in two experiments carry out in the greenhouse at different application forms of antagonists. In the first experiment, root systems of 'Roxo de Valinhos' nursery fig plants were microbiolized with 14 bacterial, separately, and 30 days after, each fig plant was transplanted into pot with soil

naturally infested with *M. incognita*. Although the root-knot nematode reduced the development of the fig trees in all treatments, the application of the isolates F25 (*Bacillus* sp.) , F78 (*Streptomyces* sp.) , F76 (*Streptomyces* sp.) , FB59 (*Pseudomonas denitrificans*) and FB34 (*Arthrobacter oxydans*) declined the root-knot nematode reproduction ($P < 0.05$) rate in the fig plants at 49, 46 , 39 , 28 and 26 % , respectively, comparing to the plants not inoculated and non microbiolized. In the second experiment, two bacteria (F75 and F78) more promising as *M. incognita* potential biocontrollers in the *in vitro* tests, were evaluated for its capacity to suppress the RKN and promoting growth of the fig plants. For this purpose, 24 hours before planting the fig nurseries, pots containing soil naturally infested with *M. incognita* were sprayed with the respective bacterial suspensions of both isolates, separately. The bacterial isolates suppressed the reproduction of *M. incognita* at rate of 21 to 43% comparing to the control where the non microbiolized fig plants were kept in infested soil. However, additional researches in this pathosystem will enable a better understanding of action mechanisms of the tested bacteria on the fig tree and the insertion of this technique in a program of root-knot nematode integrated management.

Keywords: biological control, rhizobacteria, root-knot nematode, fig, bio-characterization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados bacterianos utilizados para os testes <i>in vitro</i> e suas respectivas origens.....	35
Tabela 2	Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos para biocontrole de <i>M. incognita</i> baseado em testes de mortalidade, inibição da eclosão e capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.....	37
Tabela 3	Produção de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas por 14 bactérias selecionadas <i>in vitro</i> quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre juvenis e ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> , respectivamente. Resultados negativos (-).....	43
Tabela 4	Arranjos, morfologia e características tintoriais de bactérias selecionadas <i>in vitro</i> para controle de <i>Meloidogyne incognita</i>	43
Tabela 5	Identificação de bactérias selecionadas <i>in vitro</i> para controle de <i>M. incognita</i> por seqüenciamento de região conservada de 16S rRNA.	47
Tabela 6	Efeito do tratamento de mudas de figueira com rizobactérias sobre parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plantas e reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i>	63
Tabela 7	Coeficiente de correlação entre fator de reprodução de <i>M. incognita</i> e número de galhas, Massa fresca da raiz, número de folhas, massa seca das folhas, área foliar, clorofila A, clorofila B, clorofila total, peroxidase e polifenoloxidase.....	69
Tabela 8	Efeito do tratamento do solo com rizobactérias sobre o desenvolvimento de plantas de figueira e reprodução do nematoide das galhas (NG: número de galhas, FR: fator de reprodução de <i>M. incognita</i> , MFR: Massa fresca da raiz, NF: número de folhas, MSF: massa seca das folhas, AF: área foliar, CA: clorofila A, BC: clorofila B, CT: clorofila total, PO: enzima peroxidase, PFO: enzima polifenoloxidase; FA: Fenóis extraíveis em água).....	74

Tabela 9	Coeficiente de correlação entre fator de reprodução de <i>M. incognita</i> e massa fresca da raiz (MFR), massa seca das folhas (MSF), área foliar (AF), clorofila (CA), clorofila B (CB), clorofila total (CT), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PFO).....	76
Tabela 10	Efeito do tratamento do solo com rizobactérias sobre a nematofauna do solo.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitonematoides por bactérias isoladas de raízes de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos.....	36
Figura 2	Desempenho de bactérias selecionadas <i>in vitro</i> para controle de <i>M. incognita</i> quanto a produção de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides, inibição da eclosão e mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i>	42
Figura 3	Eficiência metabólica relativa de bactérias selecionadas <i>in vitro</i> para controle biológico de <i>M. incognita</i>	44
Figura 4	Gel de agarose com DNA extraído de bactérias selecionadas para controle biológico de <i>M. incognita</i>	45
Figura 5	Gel de agarose com fragmentos obtidos por reação em cadeia de polimerase utilizando os primers 27F e 1492R.....	46
Figura 6	Preparo das mudas por microestaquia: A- Corte de parte do caule para obtenção de estacas; B- Tratamento das estacas por imersão em gel para enraizamento; C- Estacas dispostas no solo.....	54
Figura 7	Pomar de figueira infestado com <i>Meloidogyne incognita</i> cujo solo foi utilizado para realização do trabalho, as setas indicam locais onde o produtor realizou o replantio precocemente em função da infestação pelo nematoide das galhas.....	54
Figura 8	Mudas separadas, em blocos, de acordo com o tratamento após segunda aplicação das suspensões bacterianas ou solução salina.....	56
Figura 9	Mudas de figueira antes do transplante para solo infestado com <i>Meloidogyne incognita</i>	58
Figura 10	Aspecto das raízes de figueira nos diferentes tratamentos bacterianos e detalhe das galhas ocasionadas por <i>Meloidogyne incognita</i> em figueira.....	67
Figura 11	Populações de nematoides encontradas em solo de figueira submetida a diferentes tratamentos bacterianos.....	71

Figura 12	Fator de reprodução de nematoides encontradas em solo de figueira submetida a diferentes tratamentos bacterianos.....	72
Figura 13	Aspecto visual das raízes de figueira nos diferentes tratamentos: solo autoclavado não tratado; solo natural mente infestado com fitonematoides; e: F78 e F75 - raízes provenientes de solo tratado com bactérias.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM FIGUEIRA.....	20
2.1 Introdução.....	20
2.2 Metodologia	23
2.2.1 Origem e manutenção de inoculo de <i>M. incognita</i>	23
2.2.2 Origem dos isolados bacterianos.....	23
2.2.2.1 Isolamento de bactérias da rizosfera e rizoplane de figueira.....	23
2.2.2.2 Isolamento de bactérias de rochas de folhelhos pirobetuminosos.....	24
2.2.2.3 Manutenção dos isolados bacterianos.....	25
2.2.3 Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção <i>in vitro</i> de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides.....	25
2.2.3.1 Produção de quitinases	25
2.2.3.2 Produção de lipases.....	25
2.2.3.3 Produção de proteases.....	26
2.2.3.4 Produção de amônia	26
2.2.4 Avaliação da atividade antagonista de bactérias a <i>Meloidogyne incognita</i>	26
2.2.4.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	26
2.2.4.2 Preparo das suspensões bacterianas	27
2.2.4.3 Avaliação dos isolados quanto ao efeito nematicida <i>in vitro</i> sobre juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	27
2.2.4.4 Avaliação dos isolados quanto à capacidade de inibir <i>in vitro</i> a	

eclosão de <i>Meloidogyne incognita</i>	28
2.2.5 Avaliação dos isolados, selecionados <i>in vitro</i> para controle de <i>Meloidogyne incognita</i> , quanto à produção de compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas	29
2.2.5.1 Solubilização de fosfatos	29
2.2.5.2 Produção de sideróforos	29
2.2.5.3 Produção de Auxinas	29
2.2.6 Perfil metabólico de bactérias selecionadas <i>in vitro</i> para controle de <i>Meloidogyne incognita</i>	30
2.2.7 Identificação dos isolados selecionadas <i>in vitro</i> para controle de <i>Meloidogyne incognita</i> de acordo com o perfil bioquímico e sequenciamento de DNA	30
2.2.7.1 Caracterização morfológica e bioquímica.....	31
2.2.7.1.1 Caracterização da parede celular pelo teste de Gram	31
2.2.7.1.2 Caracterização da parede celular pelo teste em KOH 3%.....	31
2.2.7.2 Identificação dos isolados através de sequenciamento de DNA	32
2.2.7.2.1 Extração do DNA	32
2.2.7.2.2 Amplificação da região de interesse através de reação em cadeia de polimerase-PCR.....	33
2.2.7.2.3 Seqüenciamento e análise dos resultados	33
2.3 Resultados e discussão.....	34
2.3.1 Avaliação efeito nematicida <i>in vitro</i> dos isolados bacterianos sobre juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	40
2.3.2 Avaliação dos isolados quanto à capacidade de inibição <i>in vitro</i> da eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	41
2.3.3 Avaliação dos isolados, selecionados <i>in vitro</i> para controle de <i>Meloidogyne incognita</i> , quanto à produção de compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas	42
2.3.4 Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados bacterianos.....	43
2.3.5 Identificação dos isolados através de sequenciamento de DNA	44
2.4 Conclusão	47
 3 AVALIAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS PREVIAMENTE SELECIONADOS <i>IN VITRO</i> NO BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM FIGUEIRA	49

3.1 Introdução.....	49
3.2 Metodologia	53
3.2.1 Obtenção de mudas de figueira cultivar roxo de valinhos	53
3.2.2 Origem e característica do solo utilizado.....	54
3.2.3 Avaliação da nematofauna	55
3.2.4 Avaliação das características químicas do solo	55
3.2.5 Preparo da suspensão bacteriana	55
3.2.6 Ensaio 1: Microbiolização de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos com isolados bacterianos para controle de <i>M. incognita</i>	56
3.2.6.1 Tratamento de mudas de figueira	56
3.2.6.2 Transplante das mudas	57
3.2.7 Ensaio 2: Potencial de isolados bacterianos no tratamento de solo visando o controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em figueira cv. Roxo de Valinhos	57
3.2.7.1 Tratamento do solo	57
3.2.7.2 Transplante das mudas	57
3.2.8 Avaliações.....	58
3.2.8.1 Influencia dos isolados bacterianos na redução de danos em figueiras parasitadas pelo nematoide das galhas.....	58
3.2.8.1.1 Avaliação da parte aérea	58
3.2.8.1.2 Avaliação das raízes	60
3.2.8.2 Influencia dos tratamentos bacterianos na nematofauna do solo.....	61
3.2.8.3 Influência dos tratamentos bacterianos na reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em figueira 'Roxo de Valinhos'.....	61
3.2.8.4 Análises estatísticas	61
3.3 Resultados e discussão.....	62
3.3.1 Microbiolização de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos com isolados bacterianos para controle de <i>M. incognita</i>	62
3.3.2 Potencial e isolados bacterianos no tratamento de solo visando o controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em figueira cv. Roxo de Valinhos	73
3.4 Conclusões	80
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A figueira (*Ficus carica* L.) é uma das mais antigas frutíferas cultivadas no mundo. Originária do Oriente Médio, ela foi introduzida em diversas regiões devido a sua capacidade de adaptação a diferentes climas, sendo cultivada tanto em regiões subtropicais quentes como em regiões de clima temperado (GIACOBBO *et al.*, 2007).

No Brasil, a cultivar Roxo de Valinhos, oriunda da Itália, deu origem aos primeiros pomares comerciais em 1910 na região de Valinhos-SP e, atualmente, é a única cultivar economicamente importante no país, caracterizando-se pela rusticidade, vigor e produtividade (MAIORANO *et al.*, 1997; PENTEADO, 1999; LEONEL, 2008).

O país destaca-se como o principal produtor de figos na América do Sul e importante exportador da fruta, sendo exportadas, em 2013, 843 toneladas de figos frescos (ALICEWEB, 2013). A produção de figos para exportação é interessante para o Brasil, pois a safra brasileira coincide com a entressafra do Egito e Turquia, que são os maiores produtores mundiais, e possui demanda na Europa, que é o principal mercado consumidor (FAO, 2013).

Além de sua expressão econômica, a ficicultura é importante por ser caracterizada como atividade de pequenas áreas, ocupando, em média, dois hectares por produtor IBGE (2013), contribuindo para a sobrevivência da propriedade agrícola familiar.

No entanto, apesar de sua importância, a produção de figos enfrenta dificuldades, principalmente em relação ao manejo fitossanitário. A cultura apresenta problemas relativos a pragas e doenças, que interferem negativamente no seu cultivo, como: nematoides (*Meloidogyne incognita* e *Heterodera ficì*), ferrugem

(*Cerotelium fici* Cast.), seca-da-figueira (*Botrydiplodia* sp.), broca-da-figueira (*Azochis gripusalis* Walk.) e mosca-do-figo (*Zaprionus indianus* Gupta.) .

O primeiro nematoide fitoparasita relatado na cultura foi o nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. nos EUA (NEAL, 1889). Desde então, várias espécies têm sido relatadas parasitando figueira em muitos países (MCSORLEY, 1981, 1992; COHN e DUNCAN, 1990; CAMPOS, 1997; KRNJAIC *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1999). No Brasil são descritos *Aphelenchoides* sp., *Aphelenchus avenae* (Bastian), *Criconemella onoensis* (Luc), *C. sphaerocephala* (Taylor.), *Helicotylenchus dihystera* (Cobb.), *Heterodera fici* (Kirjanova), *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey), *P. zaeae* (Graham), *Meloidogyne javanica* (Treub) e *M. incognita* (KOFOID & WHITE) Chitwood (CAMPOS, 1997). Entre esses, destacam-se o nematoide das galhas *M. incognita* e o de cistos, *Heterodera fici*, sendo o primeiro de ocorrência generalizada no país (LIMA-MEDINA *et al.*, 2006; DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010, LIMA-MEDINA *et al.*, 2013) e o segundo de frequência mais restrita.

Dentre os fitonematoides que afetam a figueira, o nematoide das galhas é o mais reportado, diversos relatos de danos ocorrem no Mediterrâneo, na África e nas Américas do Sul e do Norte, sendo reconhecido como maior fator limitante à produção comercial nos Estados Unidos (KNIGHT, 1980), na França (SCOTTO LA MASSÈSE *et al.*, 1984) e no Brasil (FERRAZ *et al.*, 1982; CAMPOS, 1997).

No Brasil, em levantamento realizado por Lima-Medina *et al.* (2006) e Lima-Medina *et al.* (2013) em pomares de figueira do Rio Grande do Sul e de São Paulo, foram identificadas diferentes espécies do nematoide das galhas em figueira, sendo *M. incognita* com o fenótipo de esterase I2 a espécie mais frequente em ambos estados, ocorrendo em 80 % da amostras estudadas.

As galhas decorrentes do parasitismo deste organismo alteram o funcionamento das raízes, reduzindo o fluxo de fotoassimilados (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999) e refletindo na taxa fotossintética e produtividade da planta. Essas alterações provocam redução da produção e qualidade dos frutos, direcionando o produtor a substituir as plantas em menor espaço de tempo (ROSSI, 2002). Além dos danos expressivos, os nematoides do gênero *Meloidogyne* são considerados de difícil controle devido à alta capacidade reprodutiva, à ampla gama de hospedeiros e à capacidade de adaptação a diferentes condições e ecossistemas (FERRAZ, 1985).

No Brasil o manejo do nematoide das galhas é ainda mais importante, visto que a cultivar Roxo de Valinhos é extremamente sensível ao nematoide das galhas (LIMA-MEDINA *et al.*, 2006). Além disso, a utilização de portas-enxerto resistentes, considerada uma das estratégias mais eficazes de controle, não é possível em nossas condições pela ausência de material disponível comercialmente, embora seja utilizada em outros países, como o caso da seleção de *Ficus glomerata* nos EUA, que é compatível com as variedades comerciais (BUENO; GONÇALVES; ASCÊNCIO, 2006). Outros fatores que contribuem para o problema são a ausência, no mercado brasileiro, de agrotóxicos registrados para uso na cultura de figueira (AGROFIT, 2013) e o alto custo de práticas culturais como a adubação (MEDEIROS, 2002).

Considerando as dificuldades encontradas para o controle do nematoide das galhas na figueira, nas condições brasileiras, o manejo integrado desta praga através do uso de agentes de controle biológico deve ser considerado como estratégico para o referido patossistema. Dentre os agentes de controle biológico, as rizobactérias estão entre os organismos antagonistas mais propícios no controle de fitonematoides (SIKORA, 1988). As rizobactérias atuam no controle biológico de diversas formas, podem parasitar e/ou produzir metabólitos que interferem na reprodução, postura e eclosão de ovos, na sobrevivência dos estádios iniciais de desenvolvimento dos nematoides e/ou mortalidade de indivíduos adultos (ZUCKERMAN; JASSON, 1984; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999). Esses mecanismos estão relacionados à produção de enzimas como lipases (SANTIN, 2008) proteases (DUNNE *et al.*, 1997) e quitinases (ZHANG; YUEN *et al.*, 2000), as quais podem estar envolvidas na degradação dos ovos, e/ou produção de compostos tóxicos (OKA *et al.*, 1993; ARDUIM, 2006) que atuam como nematicidas ou nematostáticos.

Além disso, as rizobactérias podem estimular o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio (VESSEY, 2003), da solubilização de fosfatos (RICHARDSON, 2001), da mineralização de matéria orgânica (ROMEIRO, 2007) e de alterações benéficas no crescimento das plantas, na morfologia e no metabolismo do sistema radicular (VESSEY, 2003) e.

Os efeitos diretos de bactérias sobre nematoides constituem importantes mecanismos de ação, e a seleção por esta capacidade é uma estratégia utilizada em muitos programas de biocontrole (PARK *et al.*, 2004; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2004; COIMBRA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.* 2005). Porém, a seleção *in vitro* não deve ser

considerada como única forma de avaliação, uma vez que a sobrevivência dos biocontroladores, bem como outros atributos são essenciais para que o efeito controlador seja alcançado.

O potencial de rizobactérias para controle de *Meloidogyne* sp. e a carência de informações sobre a eficiência desses biocontroladores torna importante a realização de novos estudos, visto a importância da cultura, o potencial de danos do parasita e a necessidade de estratégias de manejo adequadas e efetivas. Assim, os objetivos desse trabalho foram: 1) Isolar bactérias com potencial para biocontrole de *M. incognita* a partir de raízes de figueira e rochas de folhetos pirobetuminosos; 2) Caracterizar os isolados mais promissores através de testes bioquímicos e seqüenciamento de DNA; 3) Avaliar o desempenho dos isolados selecionados, sob duas formas de aplicação, no biocontrole de *M. incognita* em figueira cultivada em solo naturalmente infestado e 4) Avaliar a influência dos tratamentos bacterianos sobre a nematofauna habitante do solo.

2 CAPITULO 1

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Meloidogyne incognita* EM FIGUEIRA

2.1 Introdução

O nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita* (KOFOID; WHITE, 1919) Chitwood, 1949, é considerado o fitopatógeno mais importante para a cultura da figueira (*Ficus carica* L.) no Brasil, pois apresenta distribuição generalizada, alta agressividade e difícil controle.

Um dos fatores mais preocupantes em relação a *M. incognita* é a extensão dos danos causados em pomares de figo (CAMPOS, 1997). As espécies do gênero *Meloidogyne* induzem a formação de células multinucleadas nas raízes, denominadas de 'células gigantes', ao redor das quais são formadas as galhas, produzindo alterações que comprometem o funcionamento das raízes, reduzindo, conseqüentemente, o crescimento das plantas (KOENNING *et al.*, 1999, BIRD; KOLTAI 2000) e prejudicando a sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis (GALLETTI; REZENDE, 2005).

Em virtude dessas características o controle de *M. incognita* é considerado estratégico para viabilidade econômica dos pomares de figueira, o controle de fitonematoídeos inclui estratégias como controle químico, manejo do solo, uso de variedades e ou porta-enxertos resistentes, solarização do solo e controle biológico (RANDHAWA *et al.*, 2001, SAKHUJA; JAIN 2001). No entanto, diversos fatores dificultam o controle de *M. incognita*, como a ampla gama de hospedeiros, a capacidade de sobreviver no solo ou em restos culturais e sua fácil disseminação através de implementos agrícolas, água, animais e materiais vegetais contaminados (SANTIN, 2008). No caso brasileiro, destacam-se ainda, fatores como a carência de

porta-enxertos resistentes e produtos fitossanitários registrados para a cultura da figueira (AGROFIT, 2013).

Devido à carência de opções de controle convencionais e a importância da cultura, algumas práticas alternativas têm sido estudadas para controle de *M. incognita* em figueira, incluindo o uso de biocontroladores (ARDUIN, 2006).

Bactérias consideradas antagonistas aos nematoides podem ser encontradas no solo, nos tecidos das plantas hospedeiras e nos próprios nematoides, incluído ovos e cistos (STIRLING, 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD 1999, KERRY, 2000; MEYER 2003). Porém, segundo Melo (1998), a rizosfera é o habitat mais rico em bactérias com potencial para controle de nematoides, e, portanto, é o ambiente ideal para seu isolamento.

As bactérias encontradas no solo, sob influência das raízes, são denominadas rizobactérias e são caracterizadas pela capacidade de colonizar o sistema radicular das plantas em resposta às secreções ricas em carboidratos e aminoácidos por eles produzidos (SCHROTH; HANCOCK 1982, SUSLOW 1982, KLOPPER *et al.*, 1992). Estes micro-organismos podem atuar favorecendo o desenvolvimento das plantas ou controlando diversos fitopatógenos incluindo nematoides (STIRLING 1991, SIDDIQUI; MAHMOOD 1999).

O controle biológico de nematoides por rizobactérias pode envolver o parasitismo e/ou produção de metabólitos que interferem na reprodução, postura e eclosão de juvenis do interior de ovos, na sobrevivência nos estádios iniciais de desenvolvimento dos nematoides e/ou mortalidade de indivíduos adultos (ZUCKERMAN; JASSON, 1984, SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999). Esses mecanismos estão relacionados à produção de compostos tóxicos (OKA *et al.*, 1993), que atuam como nematicidas ou nematostáticos, e a produção de enzimas, como lipases (SANTIN, 2008) proteases (DUNNE *et al.*, 1997) e quitinases (ZHANG; YUEN *et al.*, 2000), envolvidas na degradação dos ovos.

Essas bactérias também são descritas como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de planta ou PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, pois além de sua importância como biocontroladores de doenças, quando atuam no controle biológico de organismos fitopatogênicos, (SCHROTH; HANCOCK 1982), podem atuar como: biofertilizadoras, quando aumentam a disponibilidade de nutrientes para as plantas; fitoestimuladoras, quando estimulam o crescimento da planta; e

rizorremediadoras, quando degradam poluentes orgânicos (SOMERS; VANDERLEYDEN; SRINIVASAN, 2004).

Rizobactérias podem estimular o crescimento vegetal através de diversos processos como fixação de nitrogênio (VESSEY, 2003), solubilização de fosfatos (RICHARDSON, 2001), alterações benéficas no crescimento, na morfologia e no metabolismo do sistema radicular (VESSEY, 2003), e, mineralização de matéria orgânica (ROMEIRO, 2007).

Em virtude dessas características, a maioria dos trabalhos envolvendo seleção de bactérias para controle biológico, utiliza micro-organismos oriundos do solo e rizosfera (FREITAS *et al.*, 2005; FABRY *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2011), existindo poucos relatos quanto à utilização de isolados oriundos de outros habitats (ASHOUB; AMARA, 2010).

Contudo, ambientes como as rochas compreendem formas de vida com potencial que apresentam diversas características desejáveis como resistência à dessecação e tolerância à luz ultravioleta (UV), que fazem desses micro-organismos, especialistas em sobrevivência (HIRSCH *et al.*, 2004). As bactérias encontradas nesses ambientes possuem também, um papel importante na deterioração de rochas e disponibilização de nutrientes essenciais para as plantas (GADD, 1999; GORBUSHINA, 2007).

Além disso, o efeito nematicida não é restrito às bactérias isoladas de raízes. Ashoub e Amara (2010) observaram que bactérias isoladas de outros ambientes como solos poluídos com hidrocarbonetos e água do mar vermelho, também podem apresentar efeito tóxico aos nematoides.

Considerando as dificuldades encontradas para manejo de *M. incognita* em figueira, no Brasil, e o potencial de rizobactérias e bactérias de rochas de folhelhos pirobetuminosos como agentes de controle biológico de nematoides, foi objetivo desse trabalho, avaliar o desempenho *in vitro* dos isolados obtidos de raízes de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos para o controle de *M. incognita*, selecionando os isolados mais promissores para testes *in vivo*.

2.2 Metodologia

2.2.1 Origem e manutenção de inoculo de *M. incognita*

Para obtenção do inoculo do nematoide, raízes de figueira foram coletadas de um pomar infestado com *M. incognita*, no município de Pelotas-RS. As raízes foram transferidas para vasos com solo esterilizado e mudas de tomate, (*Solanum lycopersicon* L.) cv. Santa Cruz, as quais foram plantadas para multiplicação da população do nematoide em casa de vegetação.

Após 50 dias, as fêmeas deste nematoide foram extraídas das raízes de tomateiro e submetidas à eletroforese (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001) para confirmar a pureza da população pelo perfil de esterase. Após confirmação dos resultados, as massas de ovos correspondentes foram transferidas para vasos contendo solo autoclavado e uma muda de tomateiro cv. Santa Cruz. Esse procedimento foi repetido periodicamente para manutenção do inoculo puro.

2.2.2 Origem dos isolados bacterianos

Os micro-organismos testados quanto ao potencial para controle do nematoide das galhas, em figueira, foram isolados da rizosfera e rizoplano de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos. As bactérias fazem parte da coleção de micro-organismos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado.

2.2.2.1 Isolamento de bactérias da rizosfera e rizoplano de figueira

Raízes de plantas saudáveis de figueira, coletadas na Estação Experimental Cascata da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, foram levadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Clima Temperado onde duas metodologias distintas foram utilizadas para isolamento de rizobactérias, obtendo-se isolados da rizosfera e do rizoplano.

Para obtenção de isolados da rizosfera, amostras de 10 gramas de solo rizosférico, considerado o solo associado as raízes, foram cuidadosamente coletadas, sob condições assépticas, nas raízes de figueira. As amostras de solo

rizosférico foram misturadas a 90mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e agitadas em liquidificador na velocidade máxima durante um minuto. As suspensões obtidas foram diluídas, em escala decimal, transferindo-se alíquotas de 1mL para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina, sucessivamente, até obtenção da diluição 10^{-6} . A seguir, alíquotas de 100 μ L das suspensões, nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas, por espalhamento, em triplicatas, em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970).

Para obtenção de isolados do rizopiano, segmentos de 1g de raiz de figueira, submetidos a lavagem contínua com água corrente, durante um minuto, foram transferidos para tubos de ensaio com 9mL de solução salina e submetidos a ultra-sonificação por 30 segundos a 10.5mm. As suspensões obtidas foram então diluídas, em escala decimal, transferindo-se uma alíquota de 1mL para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina, sucessivamente, até obtenção da diluição 10^{-5} . A seguir, alíquotas de 100 μ L das suspensões, nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram semeadas em triplicatas, por espalhamento em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970).

As placas semeadas com diluições de solo rizosférico e suspensões do rizopiano foram incubadas em estufa bacteriológica à 25°C por 72 horas. Após a incubação, as colônias de bactérias com características morfológicas distintas foram repicadas individualmente, por esgotamento, para obtenção de culturas puras, e identificadas com um código numérico.

2.2.2.2 Isolamento de bactérias de rochas de folhelhos pirobetuminosos

As bactérias de rochas de folhelhos pirobetuminosos foram obtidas a partir de quinze amostras de rochas coletadas no Município de São Mateus do Sul (PR). Cada amostra foi triturada e peneirada individualmente, e a seguir, 10 g de cada amostra foram transferidos para Erlenmeyers contendo 90mL de solução salina estéril onde foi agitada por 30 minutos a 10°C. As suspensões obtidas foram diluídas, em escala decimal, transferindo-se alíquotas de 1mL para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina, sucessivamente, até obtenção da diluição 10^{-4} . A seguir, alíquotas de 100 μ L das suspensões, nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , foram semeadas em triplicatas, por espalhamento em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubadas a 28°C por 48 horas.

Foram utilizados nesse trabalho, apenas aqueles isolados que apresentaram potencial para o biocontrole do nematoide das galhas e promoção de crescimento em ensaios anteriores com plantas de arroz irrigado (dados não publicados).

2.2.2.3 Manutenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram repicados periodicamente (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) para meio 523 de Kado; Heskett (1970) e mantidos sob refrigeração a 4°C. Alternativamente, os isolados de actinomicetos foram cultivados em meio Amido Caseína Agar - ACA (2,0g de KNO₃, 2,0g de NaCl, 2,0g de K₂HPO₄, 0,05g de MgSO₄.7H₂O, 0,02g de CaCO₃, 0,01g de FeSO₄.7H₂O, 10g de amido, 0,3g de caseína, 15,0g de ágar e 1000 mL de água destilada). Os micro-organismos foram também preservados em glicerol 20% (v/v) em *freezer* (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

2.2.3 Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção *in vitro* de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides

2.2.3.1 Produção de quitinases

A produção de quitinases foi testada utilizando-se a técnica descrita por Cattelan (1999). Os isolados foram repicados para meio de cultura contendo quitina como fonte exclusiva de carbono, e incubados a 25°C por quinze dias, após este período, a degradação da quitina foi constatada pela presença de um halo claro ao redor das colônias.

2.2.3.2 Produção de lipases

Para determinar a produção de lipases, os isolados foram repicados para meio de cultura de Tween 80 a 1% e pH 7,4 (FAHY; PERSLEY, 1983) e incubados a 25°C por cinco dias. Após esse período, a produção de lipases foi observada pela formação de precipitados ao redor das colônias.

2.2.3.3 Produção de proteases

A produção de proteases foi avaliada através de duas metodologias. Na primeira, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo 5mL de meio de cultura leite de Litmus, a seguir foram incubados a 25°C por cinco dias, e após o período de incubação, a produção de proteases foi verificada pela peptonização da caseína a qual foi observada, presente, pela redução da turvação do meio de cultura (SCHAAD *et al.*, 2001). Como testemunha foi utilizado um tubo contendo o meio estéril não inoculado.

Na segunda metodologia, os isolados foram repicados para tubos contendo meio de cultura de gelatina 12%, e, a seguir, foram incubados a 25°C por cinco dias e colocados em geladeira durante 2 horas. A produção de proteases de cada isolado foi avaliada pela capacidade de hidrolisar a gelatina que observada quando o meio de cultura permanecia liquefeito à 4°C (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Como testemunha, foi utilizado um tubo contendo o meio estéril não inoculado.

2.2.3.4 Produção de amônia

Para verificar a capacidade de produzir amônia, os isolados foram repicados para tubos de ensaios contendo 10mL de meio de cultura caldo de peptona e incubados a 25°C por cinco dias. Após o período de incubação, foi acrescentado em cada tubo, 1mL de reagente de Nessler. A produção de amônia foi verificada observando-se a formação de um precipitado alaranjado característico (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Como testemunha foi utilizado um tubo de caldo de peptona estéril não inoculado.

2.2.4 Avaliação da atividade antagonista de bactérias a *Meloidogyne incognita*

2.2.4.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Para realização de testes *in vitro*, foi utilizada uma população pura de *M. incognita* Est. I2 (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001) multiplicada e mantida em plantas

de tomate variedade Santa Cruz em casa de vegetação conforme já descrito no item 2.2.1.

Para obtenção de ovos de *M. incognita*, massas de ovos presentes nas raízes de tomateiro infectadas foram retiradas com um estilete e colocadas em tubo com 5mL de água. A seguir, as massas de ovos foram transferidas para um erlenmayer contendo solução de NaClO a 0,5% sendo esta agitada manualmente durante e vertida em peneira de 500 Mesh, onde os ovos retidos foram lavados diversas vezes com água destilada e recolhidos em placa de Petri com aproximadamente 10mL de água destilada (HUSSEY; BARKER, 1973).

Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, raízes de tomateiro infectadas com o nematoide, foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito 0,1% e vertidas em peneira de 100 meshes acoplada à peneira de 500 Mesh. A seguir, o conteúdo retido na peneira de 500 Mesh foi lavado diversas vezes com água destilada e transferido para funil de Baermann modificado (CHRISTIE; PERRY, 1951). Após 24h de incubação, no escuro a 25°C, os J2 foram recolhidos do funil em uma placa de Petri.

2.2.4.2 Preparo das suspensões bacterianas

Para obtenção de suspensões bacterianas, os isolados em culturas puras, foram repicados para meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubados a 25°C por 24 a 48 h. Para actinomicetos, os mesmos foram cultivados em meio Amido Caseína Agar - ACA durante 96 h. As células bacterianas crescidas no meio de cultura foram raspadas com alças de Drigalski estéreis e transferidas para solução salina estéril. As suspensões obtidas foram padronizadas (OD=0,5) em espectrofotômetro a partir da leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

2.2.4.3 Avaliação dos isolados quanto ao efeito nematicida *in vitro* sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação de 96 poços, utilizando-se cinco repetições para cada tratamento. Cada orifício da placa, foi considerado uma repetição, onde foram adicionados 50µL da suspensão bacteriana e 50µL de

uma suspensão de 50 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*. As testemunhas foram compostas de J2 imersos apenas em solução salina.

A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD a 25°C na ausência de luz. O experimento foi realizado em duplicata, sendo a percentagem de juvenis mortos avaliada após 24 e 48 horas pela adição de 10µL de NaOH (1N) em cada cavidade, onde foram considerados como mortos, os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido durante três minutos após a adição de NaOH (CHEN; DICKSON, 2000). Posteriormente, os valores de percentagem de J2 de *M. incognita* mortos, em 24 e 48h foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de Scott & Knott (1974) a 5% pelo programa SASM Agri (CANTERI *et al.*, 2001); e, o efeito do período de incubação, foi comparado pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos no teste de agrupamento foram utilizados para definir os isolados mais promissores, que foram empregados em testes *in vivo*.

2.2.4.4 Avaliação dos isolados quanto à capacidade de inibir *in vitro* a eclosão de *Meloidogyne incognita*

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação de 96 poços, foram utilizadas utilizando-se cinco repetições para cada tratamento. Cada orifício da placa foi considerado uma repetição no qual foram adicionados 50µL da suspensão bacteriana e 50µL de uma suspensão de 50 ovos imaturos de *M. incognita*. As testemunhas foram compostas de ovos imersos apenas em solução salina.

Logo após, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD a 25°C na ausência de luz. A percentagem de J2 eclodidos foi avaliada após 15 dias de incubação. Posteriormente, os valores de percentagem de J2 de *M. incognita* eclodidos foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de Scott & Knott (1974) a 5% pelo programa SASM Agri (CANTERI *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos no teste de agrupamento foram utilizados para definir os isolados mais promissores, que serão empregados em testes *in vivo*.

2.2.5 Avaliação dos isolados, selecionados *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita*, quanto à produção de compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas

Os isolados considerados mais promissores para controle de *M. incognita*, selecionados nos ensaios anteriores, foram investigados quanto a produção de compostos relacionados a promoção de crescimento vegetal.

2.2.5.1 Solubilização de fosfatos

Primeiramente, os isolados foram repicados para o meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL *et al.*, 1999) com pH 6,0, e, incubados a 25°C por sete dias. Após esse período, a solubilização de fosfatos foi verificada pela formação de um halo claro ao redor das colônias.

2.2.5.2 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Schwyn e Neilands (1987). Os isolados foram repicados para meio de cultura ágar King B (GLICKMANN; DESSAUX, 1995) suplementado com complexo cromo azurol S (CAS/ferro(III) brometo de amônio hexadeciltrimetil) e incubados a 27°C por cinco dias. Após incubação avaliou-se a presença de um halo alaranjado (cor de tijolo) ao redor das colônias, que caracteriza a produção de sideróforos.

2.2.5.3 Produção de Auxinas

A capacidade dos isolados selecionados de produzir auxinas foi determinada através de ensaio colorimétrico (GORDON; WEBER, 1951). As bactérias foram repicadas para frascos de 150mL com 25mL de Trypticaseína de soja (TSB) 10% suplementado com 150 mg/L de L-triptofano e incubados durante três dias a 25°C, no escuro. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos e foi recolhido o sobrenadante, ao qual foi incorporado reagente de

Salkowski [FeCl_3 0,5 mol/L + HClO_4 (35%)] na proporção de uma parte de reagente para duas de sobrenadante obtido.

Os sobrenadantes tratados foram mantidos no escuro durante 30 minutos para reação de manifestação da cor vermelha que indica a produção de compostos indólicos, como testemunha positiva foi utilizado meio de cultura TSB 10%estéril com 100 µg/mL da forma sintética do hormônio Ácido indol acético.

2.2.6 Perfil metabólico de bactérias selecionadas *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita*

Para determinação da atividade metabólica das bactérias, os isolados foram cultivados em meio agar tripcaseína de soja (TSA) por 24 h a 28°C. Colônias isoladas com cerca de 3mm de diâmetro foram transferidas para solução de inoculação (BIOLOG®) com um swab estéril. A seguir, 100µL da suspensão, previamente misturada em agitador de tubos, foi transferido para cada poço. As placas Biolog® GEN III foram incubadas por até 24 h a 28°C e posteriormente efetuou-se a leitura das reações observando-se a alteração de cor em cada poço de acordo com instruções do fabricante.

Os dados obtidos, foram, a seguir, transformados em dados binários, sendo atribuídos os valores de 1 ou 0 de acordo com a utilização ou não de cada fonte de carbono e a porcentagem de fontes de carbono metabolizadas foi calculada para estimar a atividade metabólica total de cada isolado.

2.2.7 Identificação dos isolados selecionadas *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita* de acordo com o perfil bioquímico e sequenciamento de DNA

Os isolados selecionados *in vitro* para controle biológico de *Meloidogyne incognita* foram caracterizados através de provas tintoriais, bioquímicas e seqüenciamento de DNA.

2.2.7.1 Caracterização morfológica e bioquímica

2.2.7.1.1 Caracterização da parede celular pelo teste de Gram

Os isolados foram caracterizados com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular através do teste de Gram. Em lamínas de vidro para microscopia, foram preparados esfregaços de cada isolado, os quais foram fixados em chama, e, a seguir, submetidos a coloração diferencial, utilizando-se reagentes para coloração de Gram (solução corante de cristal violeta, solução de lugol fraco, solução descorante à base de álcool-acetona, solução corante de fucsina fenicada para Gram). Os esfregaços corados foram então observados em microscópio óptico, usando-se a objetiva de imersão (100X). As células microbianas que apresentaram coloração púrpura escura foram consideradas Gram positivas ao passo que as coradas em tonalidade avermelhada foram consideradas com Gram negativas.

2.2.7.1.2 Caracterização da parede celular pelo teste em KOH 3%

De forma complementar, os isolados foram caracterizados quanto a estrutura da parede celular através do teste em KOH 3% (RYU, 1940). Uma gota de KOH a 3% foi depositada em uma lâmina de microscopia sobre a qual, a seguir, foi transferido o crescimento bacteriano do isolado previamente cultivado em meio sólido, sendo o material misturado por 10 segundos, com a própria alça de repicagem.

Logo após, observou-se a formação de uma massa viscosa pendente, característica de bactérias Gram-negativas. Em contraposição, os isolados que apresentaram um produto aquoso foram considerados Gram-positivos.

2.2.7.2 Identificação dos isolados através de sequenciamento de DNA

2.2.7.2.1 Extração do DNA

Para extração de DNA, os isolados selecionados para controle biológico de *M. incognita* foram cultivados em frascos com 50mL de caldo nutriente, a 25°C durante 48h. Após a incubação, o DNA das bactérias foi extraído utilizando o Kit de extração Wizard® genomic (PROMEGA), para tanto, as culturas foram centrifugadas a 18000g por 2 minutos. As células precipitadas foram ressuspensas em 480µL de EDTA 50mM, transferidas para microtubos de dois mililitros e centrifugados a 18000g por 5 minutos, para eliminar resíduos do meio de cultura.

Adiante, os precipitados dos isolados de bactérias Gram positivas receberam um tratamento para lise da parede celular, sendo ressuspensos em 120µL de solução de lisozima 10mg/mL, incubados a 37°C durante 60 minutos, resfriados a temperatura ambiente e centrifugados a 18000g por 5 minutos

Posteriormente, todas as amostras, oriundas de bactérias Gram positivas e negativas, receberam 600µL de solução de lise nuclear para suspensão do precipitado (PROMEGA®) e foram incubadas durante 5 minutos a 80°C para lise das células.

As amostras lisadas foram resfriadas a temperatura ambiente e receberam 3µL de solução de RNase A 4mg/mL, sendo agitadas por inversão 50 vezes. Em seguida, o material foi incubado a 37°C por 40 minutos para ativação da RNase, acrescido de 200µL de solução de precipitação de proteínas (PROMEGA®) e misturado em agitador de tubos na velocidade máxima durante 20 segundos

Subsequentemente, as amostras foram incubadas em gelo durante 5 minutos e centrifugadas a 18000g por 5 minutos para remoção de resíduos da lise celular. Logo após, o sobrenadante obtido, contendo o DNA, foi transferido para microtubos de 2mL contendo 600µL de isopropanol e incubado a 2°C por 12 h. O material resfriado foi agitado por inversão até que fossem observadas massas de DNA.

O DNA obtido foi precipitado por centrifugação a 18000g por 10 minutos, e lavado em 600µL de etanol 70%; novamente centrifugado a 18000g por 5 minutos e seco durante 15 minutos a 30°C em estufa de ventilação forçada, para remoção do etanol.

Para reidratação do DNA, 100µL de solução de reidratação de DNA (PROMEGA®), foram misturadas as amostras, durante 30 segundos, em agitador de tubos, sendo o DNA mantido a 4°C por 12 h para completar a reidratação.

O DNA obtido foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% usando-se o corante Blue Green Loading Dye I e marcador Low DNA Mass Ladder. Após a verificação do gel e quantificação sob luz ultra-violeta, o DNA purificado foi estocado a 2°C.

2.2.7.2.2 Amplificação da região de interesse através de reação em cadeia de polimerase-PCR

A amplificação da região 16S do gene rRNA, por reação em cadeia de polimerase (PCR), foi realizada em termociclador “Eppendorf Mastercycler”, utilizando-se os nucleotídeos iniciadores universais correspondentes às posições 27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGTACCTTGTACGACTT-3') de *Escherichia coli*. Para reação de PCR, foram utilizados 6,25µL de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA) 1,25µL do primer 27f (10µM), 1,25 µL do primer 1492r (10µM), 1µL de DNA genômico e 2,75 µL de água livre de nuclease. A reação de amplificação foi conduzida em 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; desnaturação subsequente de 95°C por 5 minutos; temperatura de anelamento de 56°C por 1 minuto; temperatura de extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos). Os produtos obtidos no PCR foram analisados em gel de agarose 2% e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O produto purificado foi quantificado em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando-se o marcador Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN).

2.2.7.2.3 Sequenciamento e análise dos resultados

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*. Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do *primer 27f* e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System*

9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v 1.0.1 (Applied Biosystems).

A homologia das sequencias bacterianas foi obtida através do programa BLAST.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Avaliação dos isolados quanto à produção de compostos relacionados ao controle biológico de *Meloidogyne incognita*

Foram obtidos 33 isolados do rizoplane e 45 isolados da rizosfera, a partir das amostras de raízes de figueira. Além disso, também foram recuperados 46 isolados de bactérias promotoras de crescimento, de rochas de folhelhos pirobetuminosos (Tab. 1).

A obtenção de numerosos isolados é importante para obtenção de agentes de controle biológico, visto que poucos isolados serão eficientes nos ensaios *in vivo*. Contudo, a avaliação de um número amplo de isolados diretamente através de testes *in vivo* é inviável, principalmente em se tratando de uma planta perene, devido a sua laboriosidade, assim testes *in vitro* são importantes para selecionar candidatos mais promissores (BARRA et al., 2008), permitindo a redução de candidatos e seleção de organismos mais promissores para controle biológico de *M. incognita*. Nessa etapa várias características desejáveis como produção de enzimas relacionadas à degradação de ovos como quitinases (STIRLING; MANKAU, 1979), proteases (DACKMAN et al., 1989) e lípases são investigadas.

Tabela 1 - Isolados bacterianos utilizados para os testes *in vitro* e suas respectivas origens.

Isolados bacterianos	Origem
F01; F02; F03; F04; F05; F06; F07; F08; F09; F10; F11; F12; F13; F14; F15; F16; F17; F18; F19; F20; F21; F22; F23; F24; F25; F26; F27; F28; F29; F30; F31; F33; F34	Rizoplane de figueira
F36; F37; F38; F39; F40; F41; F42; F43; F45; F46; F47; F49; F50; F52; F53; F56; F57; F58; F59; F60; F61; F62; F63; F64; F65; F66; F67; F68; F69; F70; F71; F72; F73; F74; F75; F76; F78; F79; F80; F81; F82; F83; F84; F85; F86	Rizosfera de figueira
FB02; FB04; FB07; FB10; FB11; FB12; FB14; FB15; FB16; FB17; FB18; FB19; FB20; FB21; FB23; FB24; FB25; FB26; FB27; FB28; FB29; FB30; FB31; FB32; FB33; FB34; FB35; FB36; FB37; FB38; FB39; FB40; FB41; FB42; FB43; FB44; FB45; FB46; FB50; FB59; FB60; FB62; FB64; FB66; FB67; FB68	Rochas de folhelhos pirobetuminosos

Dos isolados obtidos (tab. 1), sete isolados foram considerados promissores, quanto à produção de substâncias relacionadas ao biocontrole de fitonematoides, pois foram capazes de produzir quatro dos cinco compostos avaliados (Fig. 1): lípases; proteases em caseína e gelatina; e amônia. Nenhum dos isolados foi capaz de produzir todos os cinco compostos testados e apenas o isolado F83 foi capaz de degradar a quitina (Tab. 2). Apenas 15% dos isolados de figueira e 26% dos isolados de rochas não produziram nenhum tipo de composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides (Fig. 1).

A produção de enzimas líticas por rizobactérias está associada, principalmente, a inibição da eclosão dos nematoides, pois atua nos componentes estruturais dos ovos que são vitais para o desenvolvimento do embrião.

A produção de amônia também é um fator importante devido ao seu efeito tóxico aos nematoides (RODRIGUÉZ-KÁBANA et al., 1987) e foi observada na maioria dos isolados (54%) (Tab. 2).

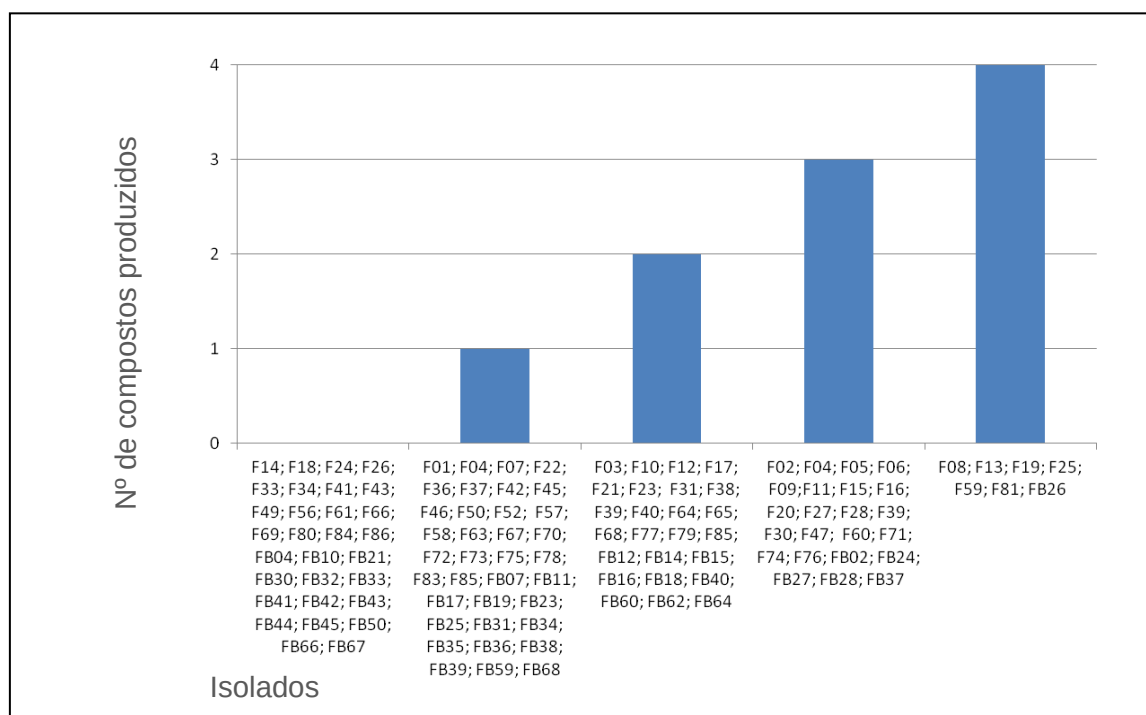


Figura 1 - Produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitonematoides por bactérias isoladas de raízes de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos.

O tegumento da casca dos ovos de *Meloidogyne* sp. funciona como uma barreira que protege os embriões de agentes químicos e biológicos e é composta por três camadas: a mais externa chamada camada vitelínica, a camada quitinosa média formada por matriz protéica incorporado com microfibrilas de quitina e a camada lipídica interna (BIRD; McCLURE, 1976). A camada lipídica é responsável por manter a impermeabilidade da casca, enquanto a camada quitinosa fornece proteção à camada lipídica e resistência estrutural; e, a camada vitelina garante a uniformidade estrutural dos ovos (WHARTON, 1980). Em função de sua importância, a degradação dessas estruturas é um dos principais mecanismos de agentes biocontroladores que parasitam ovos e as enzimas responsáveis por esse processo são produzidas por diversos fungos (LOPEZ-LLORCA; ROBERTSON, 1992; TIKHONOV et al., 2002; KHAN et al., 2004) e bactérias (MERCER et al., 1992).

Os resultados encontrados no presente trabalho (Tab. 2) demonstram que a atividade ovicida predomina entre os isolados capazes de produzir proteases e lipases, corroborando que a produção de enzimas líticas por antagonistas está relacionada à capacidade de inibir a eclosão de nematoides. Embora apenas um dos isolados tenha produzido quitinase (F83), a produção de proteases foi frequente, sendo verificada em cerca de 39% dos isolados (Tab. 2). De forma semelhante,

Arduim (2006) avaliando a capacidade enzimática de isolados de raízes de figueira para o biocontrole de *M. incognita*, também constatou que esta foi a atividade enzimática mais frequente entre as bactérias deste ambiente.

A protease é uma enzima importante visto que a camada vitelina, primeira barreira de proteção do ovo, é basicamente composta de proteína e que toda estrutura da casca do ovo é composta por pelo menos 40% de proteína (WHARTON, 1980). Segundo Wei e colaboradores (2010), a produção de proteases é um excelente indicador para recrutamento de biocontroladores. Conforme seu trabalho, foi verificada correlação positiva altamente significativa entre a produção de proteases e o biocontrole de nematoides fitopatogênicos em experimentos em casa de vegetação, porém não foi constatada correlação entre produção de quitina e biocontrole *in vivo*.

Tabela 2 - Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos para biocontrole de *M. incognita* baseado em testes de mortalidade, inibição da eclosão e capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.

Trat.	Q	L	G	T	A	Nº comp. Prod.	Mort. 24h (%)	Mort. 48h (%)	Eclosão(%**)	Inibição eclosão (%)
Salina							0,00j*	0,00m ¹	55,66f	0,00
F01	-	-	-	+	-	1	12,29h	9,29j ¹	39,50d	29,03
F02	-	+	+	-	+	3	2,00j	1,00m ¹	34,48c	38,05
F03	-	+	-	-	+	2	14,13h	13,74i ¹	43,35d	22,11
F04	-	-	-	+	-	1	7,47i	5,49m ¹	49,37e	11,30
F05	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	34,48c	38,05
F06	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	39,16c	29,63
F07	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	46,38e	16,67
F08	-	+	+	+	+	4	0,00j	0,00m ¹	13,63a	75,50
F09	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	46,50e	16,46
F10	-	+	+	-	-	2	0,00j	0,00m ¹	31,90c	42,68
F11	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	29,65c	46,72
F12	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	34,17c	38,60
F13	-	+	+	+	+	4	0,00j	15,67i ²	19,77b	64,47
F14	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	23,53b	57,71
F15	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	20,88b	62,47
F16	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	27,71c	50,21
F17	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	18,33b	67,06
F18	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	30,21c	45,71
F19	-	+	+	+	+	4	8,76i	11,54j ¹	36,57c	34,29
F20	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	28,38c	49,01
F21	-	-	+	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	30,91c	44,45
F22	-	-	-	+	-	1	8,77i	9,84j ¹	37,28c	33,01
F23	-	-	-	+	+	2	10,38i	10,76j ¹	37,00c	33,52
F24	-	-	-	-	-	0	0,00j	18,83h ²	31,39c	43,60
F25	-	+	+	+	+	4	4,09j	15,20i ²	14,57a	73,81
F26	-	-	-	-	-	0	56,93e	90,72c ²	20,60b	62,98
F27	-	+	+	+	-	3	0,00j	0,00m ¹	35,64c	35,96

continuação Tab. 2

Trat.	Q	L	G	T	A	Nº comp. Prod.	Mort. 24h (%)	Mort. 48h (%)	Eclosão(%**)	Inibição eclosão (%)
F28	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	47,97e	13,81
F29	-	+	+	-	-	3	0,00j	0,00m ¹	55,50f	0,29
F30	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	17,88b	67,86
F31	-	-	+	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	45,20d	18,78
F33	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	43,58d	21,69
F34	-	-	-	-	-	0	0,00j	10,39j ²	25,57b	54,06
F36	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	37,79c	32,10
F37	-	-	-	+	-	1	0,00j	0,00m ¹	42,07d	24,41
F38	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	37,83c	32,03
F39	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	22,20b	60,11
F40	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	47,94e	13,86
F41	-	-	-	-	-	0	2,00j	12,51j ²	40,00d	28,14
F42	-	-	-	-	+	1	56,75e	72,02d ²	32,06c	42,40
F43	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	40,90d	26,51
F45	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	30,58c	45,04
F46	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	48,82e	12,29
F47	-	+	+	-	+	3	59,6e	66,93e ¹	44,99d	19,16
F49	-	-	-	-	-	0	0,00je	0,00m ¹	36,21c	34,94
F50	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	30,20c	45,73
F52	-	-	+	-	-	1	0,00j	0,00m ¹	60,50f	-8,70
F56	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	19,11b	65,67
F57	-	-	-	+	-	1	0,00j	0,00m ¹	32,04c	42,42
F58	-	-	-	+	-	1	0,00j	0,00m ¹	33,89c	39,11
F59	-	+	+	+	+	4	0,00j	0,00m ¹	24,41b	56,13
F60	-	-	+	+	+	3	0,00j	0,00m ¹	33,87c	39,13
F61	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	33,53c	39,75
F63	-	-	+	-	-	1	0,00j	0,00m ¹	48,14e	13,51
F64	-	-	-	+	+	2	98,92a	98,87a ¹	29,50c	47,00
F65	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	24,63b	55,73
F66	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	46,24e	16,91
F67	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	55,86f	-0,37
F68	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	47,61e	14,45
F69	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	42,83d	23,05
F70	-	-	+	-	-	1	0,00j	0,00m ¹	28,38c	49,01
F71	-	+	+	-	+	3	78,07d	86,82c ¹	38,71c	30,45
F72	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	33,42c	39,94
F73	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	60,77f	-9,19
F74	-	+	+	-	+	3	0,00j	0,00m ¹	47,65e	14,38
F75	-	-	-	+	-	1	96,58b	99,0a ¹	7,55a	86,53
F76	-	+	+	+	-	3	100,00a	100a ¹	23,35b	58,04
F77	-	+	-	+	-	2	0,00j	0,00m ¹	19,69b	64,62
F78	-	-	-	+	-	1	97,33b	99,99a ¹	0,00a	100,00
F79	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	25,59b	54,01
F80	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	47,14e	15,30
F81	-	+	+	+	+	4	0,00j	0,00m ¹	38,28c	31,22
F82	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	49,07e	11,84
F83	+	-	-	-	-	1	0,00j	0,00m ¹	49,46e	11,14
F84	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	54,94f	1,28
F85	-	+	-	-	+	2	0,00j	0,00m ¹	40,21d	27,75
F86	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	26,14b	53,02
FB02	-	+	-	+	+	3	0,00j	0,00m ¹	26,00b	53,29
FB04	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	31,32c	43,73
FB07	-	-	-	+	-	1	0,00j	0,00m ¹	47,44e	14,75
FB10	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	41,28d	25,83
FB11	-	+	-	-	-	1	0,00j	0,67m ¹	42,19d	24,18
FB12	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	46,05e	17,26

conclusão Tab. 2

Trat.	Q	PL	PG	L	A	Nº comp. Prod.	Mort. 24h (%)	Mort. 48h (%)	Eclosão(%)**	Inibição eclosão (%)
FB14	-	-	-	+	+	2	1,53j	2,61m ¹	34,81c	37,44
FB15	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	44,65d	19,76
FB16	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	37,47c	32,67
FB17	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	26,42b	52,53
FB18	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	49,55e	11,07
FB19	-	-	-	-	+	1	1,00j	4,53m ¹	49,50e	11,07
FB21	-	-	-	-	-	0	0,00j	1,59m ¹	42,50d	23,64
FB23	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	29,73c	46,57
FB24	-	-	+	+	+	3	29,66g	30,67g ¹	46,61e	16,26
FB25	-	-	-	-	+	1	1,52j	0,00m ¹	27,21b	51,11
FB26	-	+	+	+	+	4	0,00j	0,00m ¹	50,00e	10,17
FB27	-	+	+	-	+	3	81,88c	85,84c ¹	24,03b	56,82
FB28	-	-	+	+	+	3	0,00j	10,31j ²	54,76f	1,62
FB30	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	50,40e	9,44
FB31	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	50,86e	8,62
FB32	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	40,82d	26,66
FB33	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	44,17d	20,64
FB34	-	-	-	-	+	1	95,5b	97,35b ¹	58,89f	-5,81
FB35	-	-	-	-	+	1	3,05j	3,94m ¹	30,35c	45,46
FB36	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	46,91e	15,72
FB37	-	+	-	+	+	3	0,00j	0,00m ¹	45,77e	17,76
FB38	-	-	-	-	+	1	1,00j	1,51m ¹	44,00d	20,95
FB39	-	-	-	-	+	1	99,44a	97,90b ¹	51,76e	7,00
FB40	-	-	+	-	+	2	1,55j	2,70m ¹	44,14d	20,70
FB41	-	-	-	-	-	0	0,00j	5,00m ²	41,84d	24,82
FB42	-	-	-	-	-	0	5,09j	9,54j ¹	47,13e	15,32
FB43	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	48,22e	13,36
FB44	-	-	-	-	-	0	36,02f	38,35f ¹	40,57d	27,11
FB45	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	19,69b	64,62
FB50	-	-	-	-	-	0	0,55j	0,00m ¹	43,87d	21,18
FB59	-	-	-	-	+	1	0,00j	0,00m ¹	15,90a	71,43
FB60	-	-	+	+	-	2	83,84c	96,00b ²	28,66c	48,50
FB62	-	-	-	+	+	2	86,2c	96,88b ²	21,00b	62,27
FB64	-	-	-	+	+	2	0,00j	0,00m ¹	27,03b	51,44
FB66	-	-	-	-	-	0	0,00j	0,00m ¹	27,61c	50,39
FB67	-	-	-	-	-	0	0,00j	9,00j ¹	44,45d	20,13
FB68	-	-	+	-	-	1	0,00j	0,00m ¹	13,62a	75,52
C.V.%							25,24	15,08	5,34	

Q- Produção de quitinases, PL-Produção de proteases em leite de litmus. PG- produção de proteases em gelatina, L- produção de lipases em Tween 80 e A- produção de amônia.

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade; ** valores originais transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. ¹ e ², não significativo e significativo, respectivamente, pelo teste de t (P≤0,05), comparando os períodos de incubação.

A produção de vários compostos pode refletir na capacidade de biocontrole dos isolados. Nesse sentido, observou-se que entre os isolados que produziram quatro compostos relacionados ao biocontrole (proteases em dois substratos, lipases e amônia), todos apresentaram percentagens de inibição da eclosão maiores que 50% (Tab. 2). Mas, apesar da importância das enzimas líticas e da amônia, sabe-se que outros mecanismos de biocontrole podem estar presentes, justificando

a importância de avaliar os isolados quanto ao efeito sobre a mortalidade e eclosão dos nematoides.

2.3.2 Avaliação efeito nematicida *in vitro* dos isolados bacterianos sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Em relação à atividade nematicida dos isolados sobre os J2 de *M. incognita*, somente 18, (14%), demonstraram algum efeito após 24 h de incubação, sendo que, 10 desses isolados, apresentaram índices de mortalidades de J2, superiores a 70%, sendo considerados potenciais biocontroladores, com destaque para o isolado F76 que atingiu 100% de mortalidade em 24 horas, e os isolados FB39, F64, F78, F75, FB34 percentagens de mortalidades superiores a 95% (Tab. 2).

Após 48 horas de incubação, a maioria dos isolados bacterianos, manteve o mesmo índice de mortalidade do nematoide ($P>0,05$) observado em 24 h de incubação. No entanto, alguns isolados apresentaram um aumento significativo na mortalidade dos J2 de *M. incognita* após 48 h de incubação (Tab. 2).

Apesar da relação entre produção de enzimas líticas e amônia e controle biológico de nematoides, observou-se que vários isolados apresentaram altas taxas de mortalidade, mesmo produzindo um reduzido número de compostos relacionados ao biocontrole (Tab. 2) indicando a presença de outras estratégias para biocontrole diferentes daquelas aqui estudadas. Ruanpanun e colaboradores (2011) demonstraram o efeito de diversos compostos obtidos a partir estreptomicetos sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de *M. incognita*, ressaltando a eficiência de substâncias nematicidas produzidas por biocontroladores como a fervulina.

Em trabalho semelhante, Arduim (2006), obteve diversos isolados de raízes de figueira, que resultaram em até 86% de mortalidade de e 77% de inibição da eclosão de J2 de *M. incognita*, sendo esses valores atribuídos, principalmente, à produção de enzimas; porém, alguns isolados não produziram nenhum tipo de enzima e foram promissores quanto à inibição da eclosão de *M. incognita in vitro*.

2.3.3 Avaliação dos isolados quanto à capacidade de inibição *in vitro* da eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Quanto ao efeito das bactérias sobre os ovos de *M. incognita*, 28 isolados (22% das bactérias testadas) reduziram em 50% ou mais a eclosão em relação à testemunha, sendo cinco desses (F08, F25, F75, FB68 e FB59) reduzindo a eclosão de J2 em mais de 70%, em relação a testemunha. Contudo, alguns isolados apresentaram efeito benéfico a *M. incognita*, incrementando em até 9% o percentual de J2 eclodidos (Tab. 2).

Entre as bactérias que se destacaram na produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitonematoides, produzindo quatro compostos, quatro deles (F08, F13, F25 e F59), foram capazes de inibir a eclosão em mais de 50% (Tab. 2).

Porém, alguns isolados que apresentaram efeito ovicida significativo, não foram capazes de produzir a maioria dos compostos testados. Assim, o isolado F78 que inibiu 100% a eclosão dos juvenis, porém produziu apenas lípases. Isso indica a importância de outros mecanismos de controle como compostos tóxicos aos nematoides (DICKLOW et al., 1993; MISHRA et al., 1987; SAMAC e KINDEL 2001; SUN et al., 2006).

De acordo com os resultados obtidos nos testes de mortalidade e eclosão, 14 bactérias foram consideradas mais promissoras, produzindo pelo menos um composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides e altos níveis de mortalidade ou redução da eclosão (Fig. 2), sendo então selecionadas para a condução de ensaios de biocontrole do nematoide das galhas em figueira, *in vivo*.

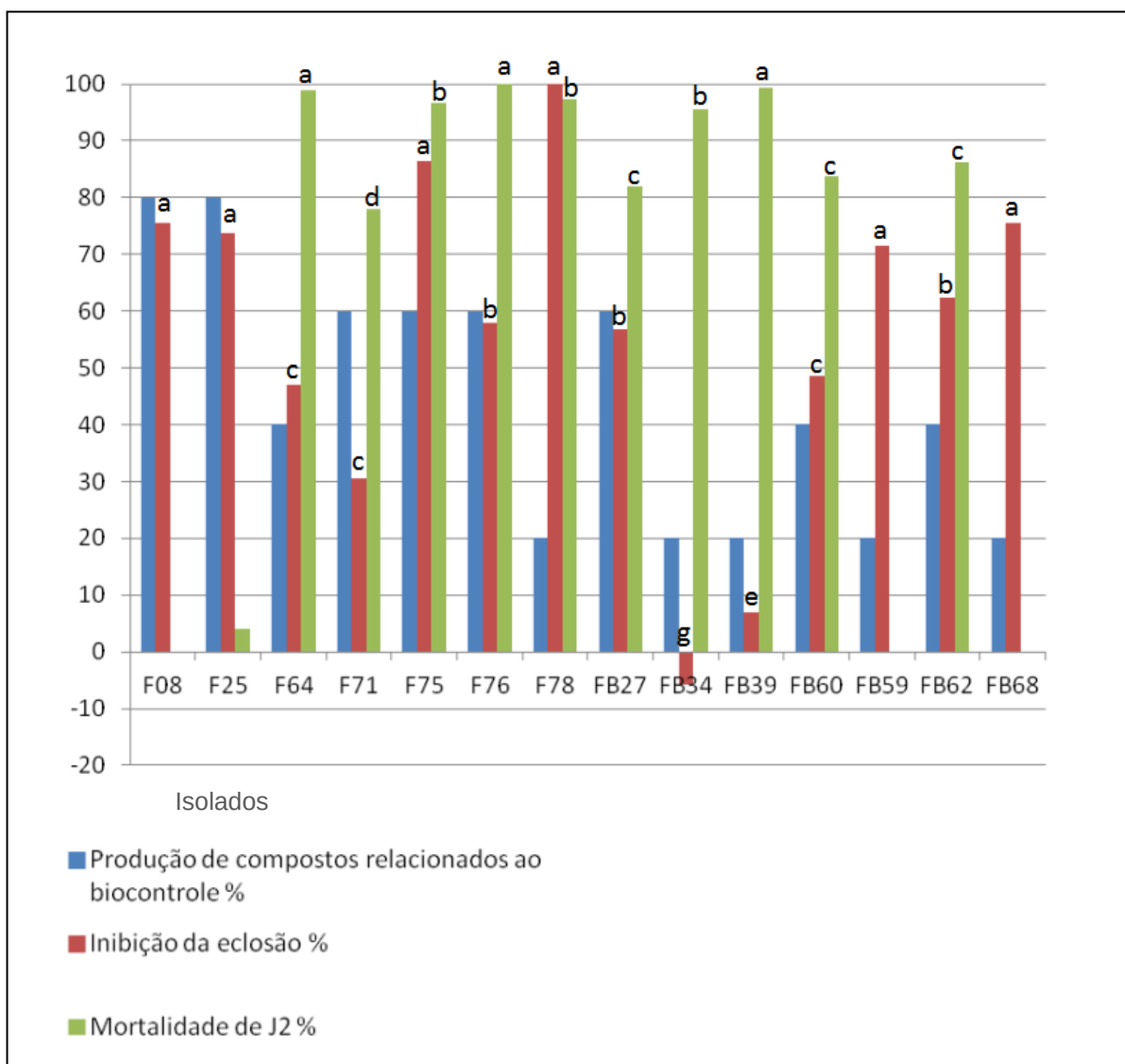


Figura 2 - Desempenho de bactérias selecionadas *in vitro* para controle de *M. incognita* quanto a produção de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides, inibição da eclosão e mortalidade de *Meloidogyne incognita*.

2.3.4 Avaliação dos isolados, selecionados *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita*, quanto à produção de compostos relacionados a promoção de crescimento de plantas

Entre as bactérias selecionadas como potencial biocontrolador de *M. incognita*, não foi observado a produção de substâncias relacionadas à promoção do crescimento (Tab. 3).

Tabela 3 - Produção de compostos relacionados à promoção de crescimento de plantas por 14 bactérias selecionadas *in vitro* quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre juvenis e ovos de *Meloidogyne incognita*, respectivamente. Resultados negativos (-).

Isolado	Produção de auxinas	Produção de sideróforos	Solubilização de fosfato
F08	-	-	-
F25	-	-	-
F64	-	-	-
F71	-	-	-
F75	-	-	-
F76	-	-	-
F78	-	-	-
FB27	-	-	-
FB34	-	-	-
FB39	-	-	-
FB59	-	-	-
FB60	-	-	-
FB62	-	-	-
FB68	-	-	-

2.3.5 Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados bacterianos

Através da caracterização dos isolados, selecionadas *in vitro* quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre *M. incognita*, constatou-se que as bactérias selecionadas, são predominantemente Firmicutes, sendo apenas um isolado de Proteobacterias (Tab. 4).

Tabela 4 - Arranjos, morfologia e características tintoriais de bactérias selecionadas *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita*

Isolados	Descrição
F08	Bacilos Gram positivos
F25	Diplo bacilos Gram positivos
F64	Bacilos Gram positivos
F71	Bacilos Gram positivos com esporos
F75	Bacilos Filamentosos Gram positivos
F76	Bacilos Filamentosos Gram positivos
F78	Bacilos Filamentosos Gram positivos
FB27	Bacilos Gram positivos
FB34	Bacilos Gram positivos
FB39	Cocos em tetrades Gram positivos
FB59	Bacilos Gram negativos
FB60	Cocos Gram positivos
FB62	Cocos Gram positivos
FB68	Cocos Gram positivos

Entre os isolados selecionados como potenciais biocontroladores de *M. incognita* predominaram bactérias Gram positivas, porém não existem relatos na literatura que evidenciem uma prevalência de biocontroladores nesse grupo específico, contudo, verifica-se que quanto ao gênero, *Pasteuria* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., são as rizobactérias biocontroladoras relatadas com mais frequência (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999; SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Os isolados selecionados *in vitro* para controle biológico de *M. incognita* apresentaram variação em relação à capacidade de metabolizar diferentes substratos (Fig. 3), essa característica está relacionada a capacidade de competir com a microbiota autóctone do solo, influenciando o desempenho dos biocontroladores (JJEMBA; ALEXANDER, 1999). Nesse sentido, o isolado F08 do rizoplano apresentou maior eficiência metabolizando mais de 70% das fontes de carbono testadas (Fig. 3).

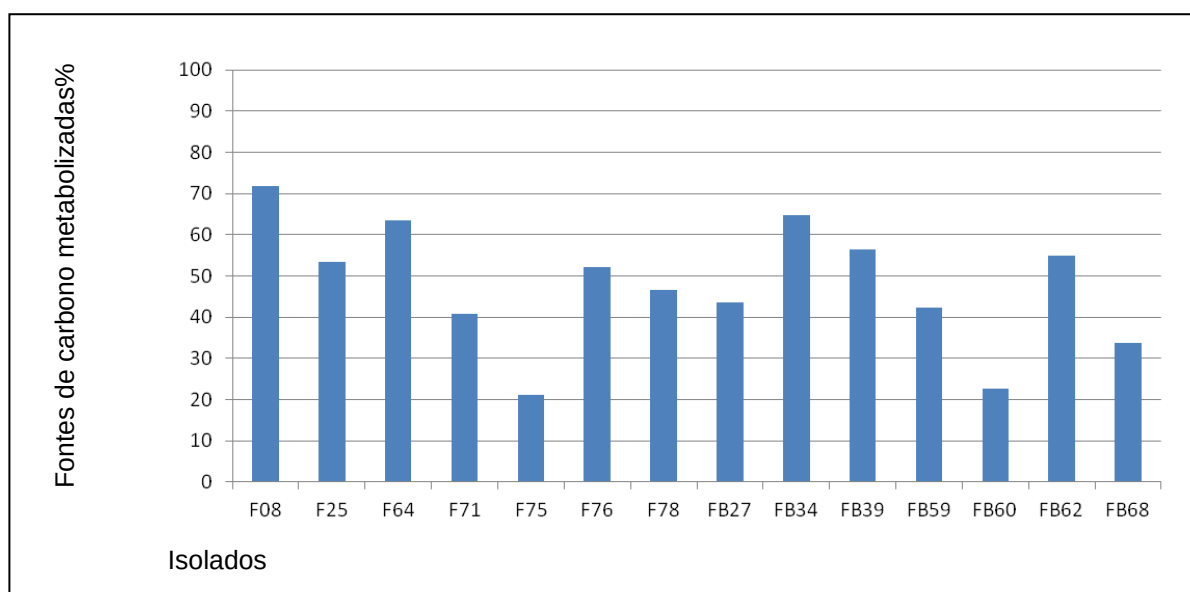


Figura 3 - Eficiência metabólica relativa de bactérias selecionadas *in vitro* para controle biológico de *Meloidogyne incognita*

2.3.6 Identificação dos isolados através de sequenciamento de DNA

O protocolo de extração e os reagentes utilizados permitiram a extração de DNA bacteriano de todos os 14 isolados testados (Fig. 4).

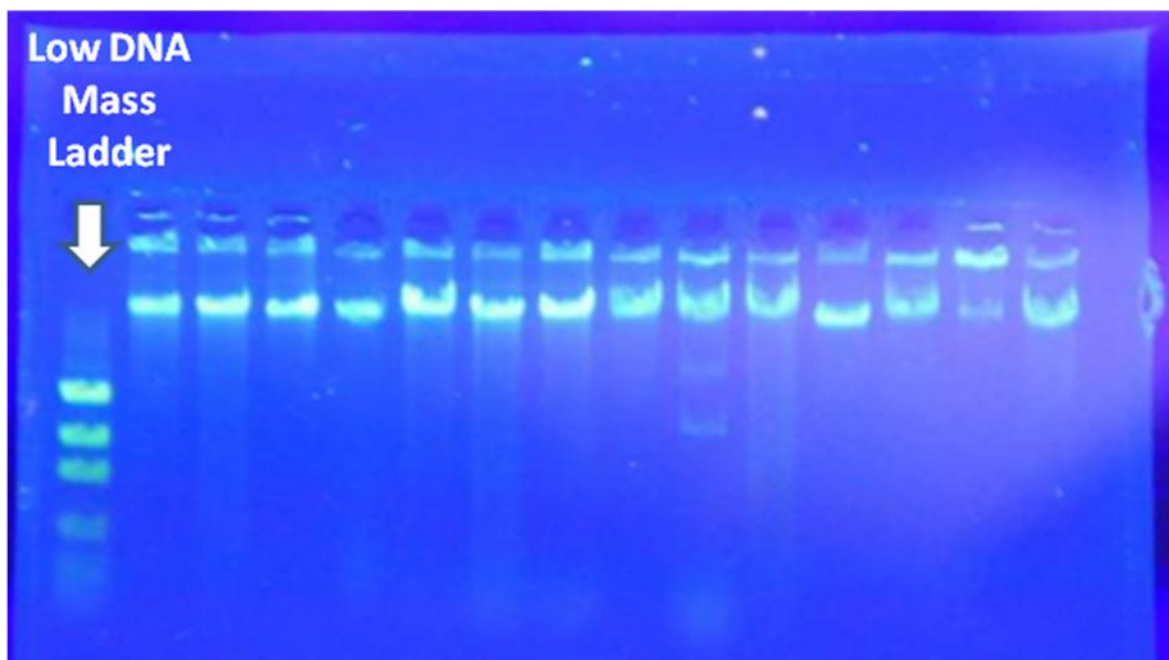


Figura 4 - Gel de agarose com DNA extraído de bactérias selecionadas para controle biológico de *Meloidogyne incognita*.

Os primers utilizados foram eficientes, amplificando o DNA de todos os isolados (Fig. 5), auxiliando a identificação da maioria dos isolados, proporcionando a identificação, ao nível de espécie, de *Microbacterium trichothecenolyticum* (YOKOTA *et al.*) Takeuchi and Hatano (F64), *Bacillus megaterium* (de Bary) (FB27), *Arthrobacter oxydans* (Sgueros 1954) (FB34), *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872 (FB39), *Pseudomonas denitrificans* (Christensen 1903) Bergey *et al.* (FB59), *Janibacter terrae* (YOON *et al.*) Lang *et al.* (FB62) e *Gordonia westfalica* (Linos *et al.* 2002) (FB68); e em nível de gênero para os isolados F08, F25, F71 (*Bacillus* sp.), F76 e F78 (*Streptomyces* sp.) (Tab. 4). Contudo os isolados F75 e FB60 não apresentaram sequências significativas (Tab. 5).

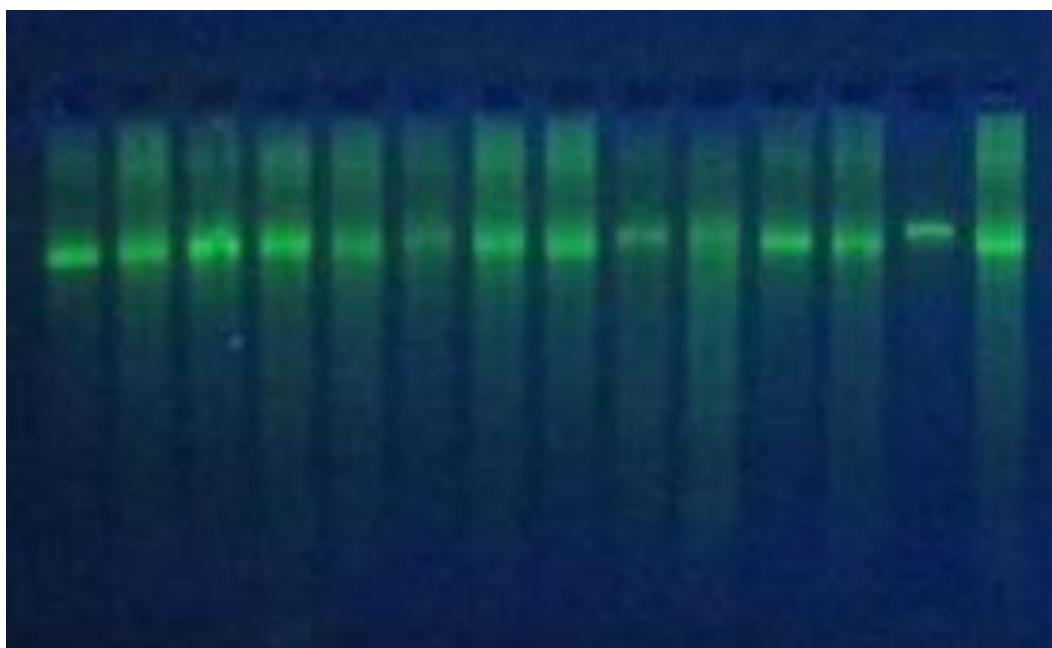


Figura 5 - Gel de agarose com fragmentos obtidos por reação em cadeia de polimerase utilizando os primers 27F e 1492R.

A identificação dos micro-organismos selecionados para biocontrole de *M. incognita* é importante no sentido de aprofundar a compreensão sobre os biocontroladores testados. No campo da ecologia microbiana, a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para a amplificação, detecção e quantificação de seqüências de DNA desde a sua introdução (OLSEN et al., 1986; SCHMIDT et al., 1991), ampliando o conhecimento sobre a biodiversidade microbiana (SHARKEY et al., 2004; STEFFAN, 1991). Além disso, a identificação dos isolados pode ser um passo importante para evitar a seleção de bactérias patogências ao homem.

Em virtude da diversidade das bactérias estudadas, optou-se por usar primers universais que amplificam regiões conservadas do gene 16S rDNA para facilitar a posterior identificação das espécies. Os primers 27F e 1492R são muito utilizados para esse fim. Embora, algumas vezes, apresentem incompatibilidade que ocorre a nível de gêneros mas não de filos (MAO et al., 2012). Nenhum dos isolados avaliados apresentou esse tipo de incompatibilidade, porém alguns obtiveram seqüências muito pequenas, em torno de 100pb, que não foram significativas para comparação. Frank e colaboradores (2008) propuseram uma modificação no primer 27F, que pode aumentar significativamente sua eficiência.

Tabela 5 - Identificação de bactérias selecionadas *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita* por seqüenciamento de região conservada de 16S rRNA

Isolado	Tamanho da seqüência obtida	Descrição	% de identidade
F08	746	<i>Bacillus</i> sp.	99
F25	765	<i>Bacillus</i> sp.	99
F64	309	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	90
F71	500	<i>Bacillus</i> sp.	99
F75	NS	-	-
F76	572	<i>Streptomyces</i> sp.	97
F78	468	<i>Streptomyces</i> sp.	97
FB27	636	<i>Bacillus megaterium</i>	98
FB34	707	<i>Arthrobacter oxydans</i>	94
FB39	785	<i>Micrococcus luteus</i>	98
FB59	351	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	96
FB60	NS	-	-
FB62	633	<i>Janibacter terrae</i>	99
FB68	740	<i>Gordonia westfalica</i>	99

NS- Fragmentos não significativos para identificação.

Considerando-se que alguns isolados não foram identificados ao nível de espécie utilizando-se os primers 27F e 1492R, o uso de novos primers mais específicos ou modificações nos primers utilizados são necessários para novo seqüenciamento e identificação de espécies. Bactérias dos gêneros *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp. podem apresentar porcentagens de identidade acima de 99,5% com espécies do mesmo gênero próximas, utilizando este par de primers, o que não permite sua identificação a nível de espécie (FOX *et al.*, 1992; SACCHI *et al.*, 2002). Sendo assim, novos seqüenciamentos com primers específicos para bactérias destes gêneros e provas bioquímicas podem ser necessários para identificação destes isolados a nível de espécie.

2.4 Conclusões

- a) Alguns isolados bacterianos provenientes de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos são capazes de produzir compostos relacionados ao biocontrole de *M.incognita* e apresentam atividade nematicida/nematostática *in vitro*.
- b) A caracterização molecular de bactérias através de reação de PCR e sequenciamento da Região 16S rRNA, associada aos métodos bioquímicos, facilitou o processo de identificação dos isolados selecionados para biocontrole de *M. incognita*.

3 CAPITULO 2

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS PREVIAMENTE SELECIONADOS IN VITRO NO BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM FIGUEIRA.

3.1 Introdução

A figueira é uma frutífera cosmopolita, pois apesar de ser considerada uma espécie originária de regiões de clima temperado, apresenta boa adaptação a uma grande quantidade de climas e de solos, desde as regiões de clima frio do Hemisfério Norte até regiões com temperaturas elevadas, como o Nordeste Brasileiro (ALVARENGA, 1995; MEDEIROS, 2002).

A cultura é tradicionalmente apreciada pelos seus frutos, que são utilizados na produção de doces tradicionais ou consumidos in natura, mas, além disso, também é valorizada devido a diversas propriedades nutraceuticas. Os frutos apresentam propriedades antioxidantes e bactericidas (OLIVEIRA et al., 2009), elevado teor de cálcio, ferro, potássio e fibras alimentares (SLAVIN, 2006). Ademais, as folhas e o látex da planta apresentam diversas propriedades como efeito imunomodulador (PATIL; BHANGALE; PATIL, 2010) e hepatoprotetor (KRISHNA et al., 2007).

O Brasil é considerado o maior produtor de figos da América do Sul (FAO, 2013). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo a produção paulista, destinada principalmente, para o mercado de frutas “in natura” e dos outros estados, para o processamento industrial (LEONEL, 2008). Em 2011 a safra gaúcha foi de 13.880 toneladas, o que correspondeu a cerca de 53% da produção nacional (IBGE, 2013), superando os resultados do censo agropecuário anterior, onde a produção do estado representava 39,42% da produção brasileira (LEONEL, 2008). A produção gaúcha destaca-se,

também, por sua importância para agricultura familiar, visto que os pomares são pequenos, com média de dois hectares por produtor IBGE (2013).

Mas, apesar de sua expressão econômica a cultura enfrenta dificuldades em relação ao manejo fitossanitário, principalmente em relação ao controle de nematoides (GOMES *et al.*, 2009). Dentre esses, já foram relatados em figueira, no Brasil, *Aphelenchoides* sp., *Aphelenchus avenae* (Bastian), *Criconemella onoensis* (Luc), *C. sphaerocephala* (Taylor.), *Helicotylenchus dihystra* (Cobb.), *Heterodera fici* (Kirjanova), *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey), *P. zae* (Graham), *Meloidogyne javanica* (Treub) e *M. incognita* (KOFOID & WHITE) Chitwood (CAMPOS, 1997).

Contudo, o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) é considerado o mais importante entre as pragas de solo, pois limita seriamente a produção (McSORLEY, 1981; McSORLEY, 1992; EL-BORAI; DUNCAN, 2005; ABRANTES *et al.*, 2008). Levantamentos de Lima-Medina e colaboradores (2013) demonstram ainda, que *M. incognita* está amplamente distribuído no Rio Grande do Sul, ocorrendo em todos os pomares amostrados, com destaque para o fenótipo esterástico I2 que é o mais frequente.

Os danos ocasionados pelo nematoide das galhas podem ser mais severos do que os da ferrugem (*Cerotelium fici* Cast.) e demais doenças. As galhas decorrentes do parasitismo de *Meloidogyne* spp. alteram o funcionamento das raízes, reduzindo o fluxo de fotoassimilados (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999) refletindo na taxa fotossintética e produtividade da planta, com diminuição na qualidade dos frutos, direcionando o produtor a substituir as plantas em menor espaço de tempo (ROSSI, 2002). Ademais, as lesões radiculares facilitam a infecção por outros patógenos e podem resultar no deslocamento do córtex radicular, paralisação do crescimento, rachaduras e deformação das raízes. Em resposta às lesões radiculares, a planta pode emitir novas raízes, mas quando a infestação é intensa a figueira fica enfraquecida e pode morrer (BUENO; GONÇALVES; ASCÊNCIO, 2006).

Além dos danos expressivos, os nematoides do gênero *Meloidogyne* são considerados de difícil controle devido à alta capacidade reprodutiva, ampla gama de hospedeiros e capacidade de adaptação a diferentes condições e ecossistemas (FERRAZ, 1985).

Uma das formas mais eficientes de controle é a utilização de variedades resistentes. Mas, apesar de existirem aproximadamente 25 cultivares de figueira no

Brasil, a cultivar, 'Roxo de Valinhos', extremamente sensível ao nematoide das galhas (LIMA-MEDINA *et al.*, 2006), é a cultivar mais utilizada no país, por ser uma rústica, vigorosa, produtiva, adaptada ao clima e ao sistema de poda drástica (ALVARENGA, 1995).

A ausência, no mercado brasileiro, de agrotóxicos registrados para uso na cultura de figueira (AGROFIT, 2013) agrava essa situação. Além disso, as práticas culturais disponíveis como a adubação, utilizadas para reduzir a severidade da doença, apresentam custo alto e são incompatíveis com os lucros do produtor (MEDEIROS, 2002), o que tem contribuído seriamente pela estagnação da produção brasileira e da área plantada (IBGE, 2013).

Considerando as dificuldades encontradas para o controle do nematoide das galhas, na figueira, em nossas condições; o manejo integrado desta praga através do uso de agentes de controle biológico pode ser uma alternativa de manejo da doença. Assim, a avaliação da eficiência destes métodos *in vivo*, assim como o estudo dos mecanismos de ação dos biocontroladores sobre nematoides são importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle adequadas à cultura da figueira nos pais.

O controle biológico de nematoides é considerado uma técnica aplicada na redução dos danos causados por estes organismos, por meio da ação de agentes antagonistas (SILVEIRA, *et al.*, 2001). Essa redução de danos pode ocorrer em função da diminuição na população dos nematoides e/ou pela redução da capacidade desses fitoparasitas de causarem danos a cultura. Essa redução pode ocorrer naturalmente pela presença de antagonistas na microbiota do solo e da planta hospedeira (NAVES; CAMPOS, 1991; HALLMAN; SIKORA, 1996); pode requerer a manipulação do ambiente, favorecendo o desenvolvimento de antagonistas presentes (SARATHCHANDRA *et al.*, 1996) ou, a introdução em massa de antagonistas, produzidos em condições controladas (PRAKOB *et al.*, 2009).

Diversos agentes de biocontrole têm sido avaliados para controle de fitonematoides, incluindo bactérias (FREITAS, CARNEIRO, 2000; GOMES *et al.*, 2002), fungos (OLIVEIRA *et al.* 2009; MAIA *et al.*, 2001) dentre outros inimigos naturais, além de vários compostos bioativos extraídos desses organismos antagonistas (LI *et al.*, 2007) e de plantas (GARDIANO *et al.*, 2009).

As pesquisas visando à aplicação de bactérias no controle de nematoides estão voltadas principalmente para componentes da rizosfera com capacidade de modificar este ambiente, afetando direta ou indiretamente os fitonematoides (MACHADO *et al.*, 2012). Estudos de Arduin e colaboradores (2006) e Santos *et al.* (2006) já demonstraram o potencial de rizobactérias isoladas de figueira na inibição de *M. incognita* *in vitro* e *in vivo*. Contudo, estudos sobre bactérias isoladas de outros habitats, e estudos *in vivo* considerando a capacidade desses micro-organismos competirem com a microbiota autóctone do solo, promover crescimento e induzir resistência, precisam ser ampliados e melhor explorados para adequação ao patossistema figueira- nematoide das galhas.

As rizobactérias, também conhecidas como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), são bactérias que colonizam as raízes das plantas na presença da microbiota nativa do solo (SCHROTH, HANCOCK, 1982) podendo promover o crescimento da planta e/ou atuar no controle biológico de patógenos fitoparasitas (KLOEPPER; SCHROTH, 1978).

O controle de nematoides por rizobactérias pode envolver vários processos, como: parasitismo; produção de enzimas e metabólitos tóxicos que podem atuar como nematicidas e/ou afetar o movimento do nematoide; inibição de eclosão de juvenis dos ovos. e interferência no processo de reconhecimento planta-hospedeiro afetando a penetração dos juvenis nas raízes; indução de resistência da planta e/ou produção de substâncias que favoreçam o desenvolvimento saudável da espécie vegetal (OKA *et al.*, 1993; MANKAU 1980; STIRLING 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD 1999; TIAN *et al.* 2007; CHEN *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1995a,b).

Provavelmente vários mecanismos de ação dessas bactérias atuam em sinergismo para controle dos nematoides, embora poucos sejam mais proeminentes. Entre esses mecanismos, o aspecto biocontrole de fitopatógenos é frequentemente destacado em pesquisas (BECKER *et al.*, 1988; WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; CRONIN *et al.*, 1997; CAMPOS *et al.*, 1998; CARNEIRO *et al.*, 1998; SIDDIQUI *et al.*, 2001; NAVES *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2004; COIMBRA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2005).

Apesar de todos os relatos, a respeito do potencial biocontrolador dessas bactérias, existem muitas dúvidas em relação à distribuição, diversidade e modo de ação dos micro-organismos associados às plantas agrícolas. Isso ocorre, em parte, devido às dificuldades de identificar microorganismos e isolar populações

representativas (PROSSER, 2002). Além disso, aqueles isolados que conseguem crescer em meio de cultura não são necessariamente metabólicos ou numericamente dominantes no meio de origem (NANNIPIERI *et al.*, 2003), e, muitas vezes não alcançam os resultados esperados, ou demonstrados *in vitro*, pois não são capazes de competir com a microbiota autóctone do solo.

Nesse sentido é importante avaliar a eficácia de rizobactérias em condições mais próximas as condições de campo, simulando a competição com os demais micro-organismos do solo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de bactérias selecionadas *in vitro* para o controle de *M. incognita* quanto à capacidade de reduzir os danos causados pelo nematoide *in vivo*, em plantas de figueira cultivadas em solo naturalmente infestado, em casa de vegetação.

3.2 Metodologia

Para verificar o potencial dos isolados bacterianos no controle *M. incognita*, foram realizados dois ensaios em casa de vegetação, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. No primeiro, os 14 isolados bacterianos que apresentaram maior efeito nematicida e redução na eclosão de J2 de *M. incognita*, *in vitro* (Capítulo 1, item 2.3.1 e 2.3.2), foram testados no tratamento prévio de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos cultivadas, em solo naturalmente infestado. No segundo ensaio, somente dois isolados, considerados mais promissores quanto à capacidade de inibir a eclosão e quanto ao efeito nematicida em testes *in vitro*, foram avaliados quanto seu potencial biocontrolador no tratamento do solo naturalmente infestado com *M. incognita*, antes do plantio de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos, em vaso, em casa de vegetação.

3.2.1 Obtenção de mudas de figueira cultivar roxo de valinhos

Para obtenção de microestacas de figueira cv. Roxo de Valinhos, ramos de 0,5-1,0 cm de diâmetro foram extraídos de plantas mantidas em casa de vegetação, no início do mês de julho/2012. A seguir, microestacas de 3 a 5 cm de comprimento foram retiradas da parte intermediária dos ramos. Cada microestaca sofreu uma pequena lesão lateral na parte inferior na casca e foi imersa cerca de 1 cm de sua extremidade, em gel para enraizamento Clonex® (0,3% ácido indol butírico) durante

30 seg. Em seguida, as microestacas foram colocadas em copos de 300 mL contendo solo autoclavado e mantidas em casa de vegetação (Fig. 6).

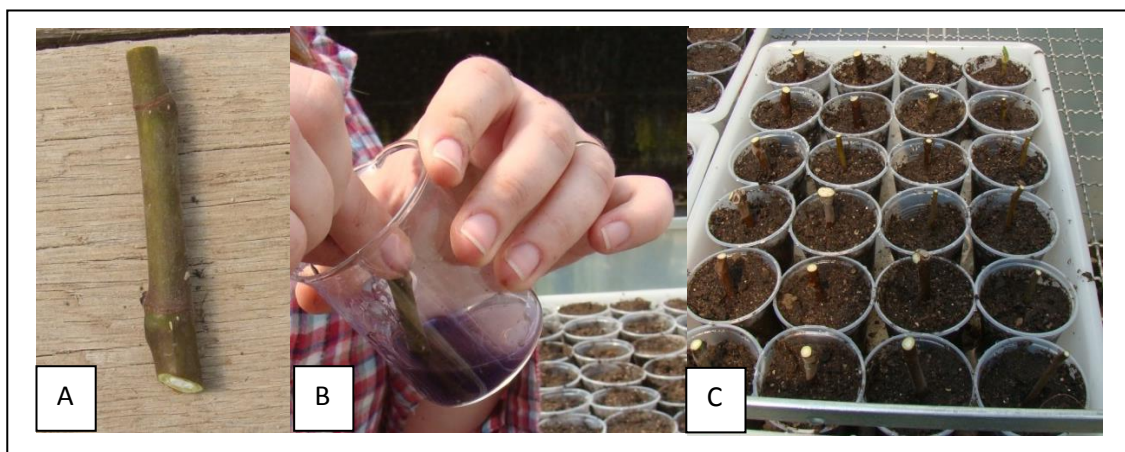


Figura 6 - Preparo das mudas por microestaquia: A- Corte de parte do caule para obtenção de estacas; B- Tratamento das estacas por imersão em gel para enraizamento; C- Estacas dispostas no solo.

3.2.2 Origem e característica do solo utilizado

O solo utilizado nos experimentos (solo franco-arenoso, 14% de argila, 19,6% de silte, 66,7% de areia e textura= 4,0), foi proveniente de um pomar de figueiras cv. Roxo de Valinhos, naturalmente infestado com *M. incognita* (Est. 12) e outros nematoides, e, situado na localidade de Vila Nova, Pelotas-RS (Fig. 7)



Figura 7 - Pomar de figueira infestado com *Meloidogyne incognita* cujo solo foi utilizado para realização do trabalho, as setas indicam locais onde foi realizado o replantio de mudas.

3.2.3 Avaliação da nematofauna

O solo coletado (item 3.2.2) foi levado a Embrapa Clima Temperado, homogeneizado, e processado para determinação da população inicial dos diferentes nematoides fitoparasitas e de vida-livre/250cm³ de solo. Para tanto, quatro alíquotas de 250cm³ desse solo foram processadas para extração dos nematoides (JENKINS, 1964). A caracterização e confirmação da espécie de *Meloidogyne* presente no local foram realizadas pela extração de fêmeas leitosas das raízes de figueira e posterior avaliação da isoenzima esterase em eletroforese (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001). Os demais gêneros fitoparasitas e de vida livre foram identificados através de observações microscópicas das características morfológicas, utilizando-se a chave de Mai (1996) e por meio da chave de diagnóstico interativo de nematoides parasitas de plantas, vida livre e predadores (UNL NEMATOLOGY LAB, 2012).

3.2.4 Avaliação das características químicas do solo

Antes e após realização dos experimentos, amostras de solo foram encaminhadas ao laboratório de fertilidade do solo da Universidade Federal de Santa Maria, a fim de se realizar as respectivas análises químicas das amostras. O carbono orgânico (matéria orgânica) foi determinado pelo método Walkley-Black conforme Alisson (1965). Os cátions trocáveis (Ca, Mg, Na, Al, e Mn) e o pH em água foram analisados pelas metodologias descritas por Tedesco *et al.* (1995). O fósforo e o potássio foram determinados pelo método Mehlich conforme Tedesco *et al.* (1995), e a acidez potencial (H + Al), conforme descrito por Embrapa (1999).

3.2.5 Preparo da suspensão bacteriana

Para obtenção de suspensões bacterianas, os isolados selecionados (Tab. 3), mantidos em culturas puras a 4°C, foram repicados para meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubados a 25°C por 24 a 48 h. Alternativamente, os isolados de actinomicetos foram cultivados em meio Amido Caseína Agar - ACA (2,0 g KNO₃, 2,0 g NaCl, 2,0 g K₂HPO₄, 0,05 g MgSO₄·7H₂O, 0,02 g CaCO₃, 0,01 g FeSO₄·7H₂O, 10 g amido, 0,3 g caseína, 15,0 g ágar, 1000 mL de água destilada) durante 96 h.

Após a incubação, realizou-se a raspagem do meio de cultura das placa contendo os respectivos isolados com alças de Drigalski estéreis e suspensão em solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A seguir, as suspensões foram calibradas em espectrofotômetro a partir da leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nanômetros, sendo padronizadas em $A=0,5$.

3.2.6 Ensaio 1: Microbiolização de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos com isolados bacterianos para controle de *M. incognita*

3.2.6.1 Tratamento de mudas de figueira

Para microbiolização, foram utilizadas mudas de figueira com quatro meses de idade, dispostas em copos plásticos de 300mL, que receberam duas aplicações de 30mL de suspensão bacteriana $OD=0,5$, diretamente no solo com intervalo de 15 dias entre cada aplicação. As testemunhas, nas mesmas condições, receberam apenas solução salina (Fig. 8).



Figura 8 - Mudas separadas, em blocos, de acordo com o tratamento após segunda aplicação das suspensões bacterianas ou solução salina.

3.2.6.2 Transplante das mudas

Decorridos 15 dias após a última microbiolização, as mudas de figueira foram transplantadas para vasos contendo 2,8kg de solo naturalmente infestado por nematoides, com um inoculo estimado em 5.850 J2 de *M. incognita*, 3.280 *Helicotylenchus* sp e 3.830 nematoides de vida-livre. Cada tratamento foi composto de seis repetições contendo uma planta/vaso. Foram utilizados dois tratamentos para as testemunhas; no primeiro, mudas tratadas apenas com solução salina, foram transplantadas para vasos contendo solo da mesma origem dos demais, porém previamente autoclavado; no segundo, mudas tratadas apenas com solução salina foram transplantadas para solo naturalmente infestado, assim como os demais tratamentos.

3.2.7 Ensaio 2: Potencial de isolados bacterianos no tratamento de solo visando o controle de *Meloidogyne incognita* em figueira cv. Roxo de Valinhos

3.2.7.1 Tratamento do solo

Vasos contendo 2,8kg de solo naturalmente infestado por *M. incognita*, *Helicotylenchus* sp. e nematoides de vida livre, conforme níveis populacionais informados no item 3.2.6.2, receberam 100mL de suspensão bacteriana OD=0,5. Como testemunha, vasos contendo solo naturalmente infestado, autoclavado ou não, receberam 100mL de solução salina (0,85% NaCl). Após, os vasos foram vedados com sacos plásticos e mantidos em temperatura ambiente por 48 h, tempo que proporcionou maiores índices de mortalidade no teste *in vitro* (Capítulo 1, item 2.3).

3.2.7.2 Transplante das mudas

Após o tratamento do solo, cada vaso recebeu uma muda de figueira cv. Roxo de Valinhos com aproximadamente cinco meses de idade (Fig. 9).



Figura 9 - Mudas de figueira antes do transplante para solo infestado com *Meloidogyne incognita*.

3.2.8 Avaliações

3.2.8.1 Influencia dos isolados bacterianos na redução de danos em figueiras parasitadas pelo nematoide das galhas

3.2.8.1.1 Avaliação da parte aérea

Coleta do material:

Decorridos quatro meses após o transplante das mudas de figueira para vasos, as folhas da planta foram coletadas para determinação da área foliar; número de folhas; teor de clorofila A, B e total; peso seco e teor de compostos fenólicos.

Ao fim do experimento, cinco meses após o transplante das mudas para os vasos, amostras de casca do caule das figueiras foram cuidadosamente retiradas com um bisturi e transferidas para sacos plásticos em recipientes com gelo para determinação da concentração das enzimas peroxidase e polifenol-oxidase. A seguir, o material foi levado ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, onde foi pesado para obtenção de amostras de 0,2g, as quais foram acondicionadas em microtubos e congeladas em freezer a -20°C.

Determinação da área foliar, do número e massa seca das folhas:

Determinou-se o número de folhas presentes por planta; e a seguir, estimou-se a área foliar (cm²) de cada repetição em medidor (LI-COR, modelo LI-3100). A seguir, as folhas foram secas em estufa a 35°C até atingirem peso constante. Após secagem, a massa seca total das folhas por planta foi determinada em balança de precisão.

Determinação dos níveis de clorofila A, B e total:

As análises para avaliação dos índices de clorofila A, B e total foram realizadas no terceiro par de folhas das plantas utilizando-se o medidor ClorofiLog® (Falker Automação Agrícola Ltda, Porto Alegre-RS).

Determinação de compostos fenólicos extraíveis em água:

Amostras de folhas secas de cada repetição foram trituradas em moinho de facas e pesadas para a extração dos compostos fenólicos, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado, segundo metodologia de Swain, Hillis (1959), utilizando água como extrator. A calibração foi realizada por espectroscopia segundo método de Folin e Ciocalteau (1927), utilizando o ácido tânico como padrão.

Determinação da atividade enzimática de peroxidase e polifenoloxidase:

As análises de enzimas foram realizadas segundo a metodologia descrita por Campos e Silveira (2003). As amostras de casca de figueira congeladas foram maceradas com 1 g de polivinilpirrolidona-10 em cadinho gelado utilizando um pistilo. A seguir, o macerado foi homogeneizado com 6 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH7,0). O material obtido foi transferido para tubos de ensaio e centrifugado a 4000g por 20 minutos a 3°C. O sobrenadante obtido, composto pelo extrato enzimático de casca de figueira, foi transferido para tubos limpos e mantido em gelo para posterior determinação da atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase.

Para determinação da peroxidase (CAMPOS; SILVEIRA, 2003), as amostras foram preparadas em tubos contendo 2,5mL de tampão fosfato-citrato, pH5,0, contendo solução de fosfato de sódio dibásico 0,2M e ácido cítrico 0,1M; 1,5mL de extrato enzimático; e 0,25mL de guaicol a 0,5%. O material foi homogeneizado em

agitador de tubos por 15 seg., e, a seguir, foram transferidos 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 3% para cada tubo que foi novamente misturado em agitador de tubos por 15 seg. Todo material utilizado foi previamente resfriado e mantido em banho de gelo durante todas as operações. Como solução em branco, amostras foram preparadas sem extrato enzimático, com 1,5 mL de água destilada e os demais reagentes. As amostras preparadas e homogeneizadas foram colocadas em banho Maria a 30°C por 15 minutos e a seguir, foram transferidas para banho de gelo, receberam 0,25 mL de solução de beta bissulfito de sódio 2% e foram misturadas em agitador de tubos por 15 segundos. Após repouso de 10 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em unidade enzimática (UE), definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade por minuto de absorbância.

Para determinação da polifenoloxidase (CAMPOS; SILVEIRA, 2003) as amostras foram preparadas em tubos contendo 3,6mL de tampão fosfato 0,05 M, pH6; 1 mL de extrato enzimático e 0,1 mL de catecol 0,1M. Todo material utilizado foi previamente resfriado e mantido em banho de gelo durante todas as operações. Como solução em branco, amostras foram preparadas sem extrato enzimático, com 1 mL de água destilada e os demais reagentes. Após homogeneizar as amostras em agitador de tubos por quinze segundos, o material foi submetido a banho Maria por 30 minutos a 30°C. Em seguida, o material foi colocado em banho de gelo e cada tubo recebeu 0,2 mL de ácido perclórico 1,4%, foi agitado em agitador de tubos e mantido em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 395 nm, os resultados obtidos foram expressos em unidade enzimática (UE), definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade por minuto de absorbância.

3.2.8.1.2 Avaliação das raízes

Ao final do experimento, cinco meses após o transplante das mudas de figueira para vasos, as plantas foram cuidadosamente retiradas e imediatamente levadas para laboratório separou-se o sistema radicular da parte aérea. As raízes foram então lavadas em água corrente, ligeiramente enxugadas em papel toalha,

pesadas para determinação da massa fresca, fotografadas e avaliadas quanto ao número de galhas presentes. No intervalo dos procedimentos descritos, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos sob refrigeração a 3-6°C.

3.2.8.2 Influência dos tratamentos bacterianos na nematofauna do solo

Ao fim do experimento as plantas foram retiradas dos vasos e solo foi homogeneizado, a seguir, alíquotas de 250cm³ de solo foram coletadas e processadas para extração dos nematoides (JENKINS, 1964). A seguir, as amostras foram observadas ao microscópio para determinar os gêneros fitoparasitas e de vida livre presentes através das características morfológicas utilizando-se a chave de Mai (1996).

3.2.8.3 Influência dos tratamentos bacterianos na reprodução de *Meloidogyne incognita* em figueira 'Roxo de Valinhos'

Para determinar o número de ovos por planta e o fator de reprodução de *M. incognita*, as raízes foram processadas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (HUSSEY; BARKER, 1973). A partir de cada suspensão, foi determinado o número total de ovos presentes por planta e calculado o fator de reprodução de *M. incognita* planta (número final de ovos+J2 no solo/ número inicial de ovos e J2) (OOSTENBRINK, 1966).

3.2.8.4 Análises estatísticas

Os valores relacionados ao número de galhas ($\sqrt{x+1}$), número de ovos, J2, população final e fator de reprodução dos nematoides, massa fresca da raiz, massa fresca da parte aérea, área foliar, número de folhas, atividade enzimática da peroxidase e polifenoloxidase, teor de compostos fenólicos, obtidos em cada ensaio, foram primeiramente submetidos a ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SAS. (SAS System 9.0, SAS Institute, Cary, NC-USA).

Adicionalmente, as variáveis massa fresca da raiz, massa fresca das folhas, área foliar, atividade da peroxidase e polifenoloxidase e teor de fenois obtidas em cada ensaio, foram correlacionadas com os respectivos valores de fator de reprodução de *M. incognita* de cada tratamento utilizando-se o mesmo programa, sendo considerados significativos, os valores de R com $0,01 > P < 0,05$.

Os valores relacionados às populações finais e fatores de reprodução dos nematoides de vida livre e de outros fitonematoides na análise de solo foram expressos em médias dos tratamentos no primeiro ensaio (item 3.2.5); enquanto no segundo ensaio (item 3.2.6.) foram primeiramente submetidos à ANOVA, e, a seguir, comparadas às médias dos tratamentos pelo teste de Duncan a 5% pelo programa SAS.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Microbiolização de mudas de figueira cv. Roxo de Valinhos com isolados bacterianos para controle de *M. incognita*

Quanto ao efeito antagônico das bactérias utilizadas para microbiolização de mudas de figueira, observou-se que sete isolados suprimiram a reprodução de *M. incognita* em relação à testemunha mantida em solo naturalmente infestado ($P < 0,05$). No entanto, a microbiolização das figueiras com os isolados F25, F78 e F76 resultou nos menores valores de FR suprimindo em 49, 46 e 39% a reprodução do nematoide, respectivamente, (Tab. 6).

De forma geral, todas as plantas de figueira submetidas aos diferentes tratamentos, em solo infestado com *M. incognita*, apresentaram elevado número de galhas e sistema radicular drasticamente reduzido com até 17% da massa encontrada naquelas plantas desenvolvidas na ausência do nematoide (Tab. 6).

Também, foi possível observar que os danos decorrentes da alta infestação pelo nematoide das galhas refletiram negativamente na parte aérea das figueiras, onde a massa seca das folhas, a área foliar e o teor de clorofila manifestaram redução significativa para os diferentes parâmetros ($P < 0,05$) comparando-se as testemunha inoculada e não inoculada (Tab. 6).

Observou-se que de uma forma geral, houve maior exportação de nutrientes do solo para as raízes e parte aérea daquelas plantas não parasitadas pelo

nematoide; no entanto, alguns isolados favoreceram maior translocação de macronutrientes como P para o desenvolvimento das plantas, assim, menores valores de 'P' no solo, foram encontrados nos tratamentos com F08, F75, F76 e F78. Já para o macronutriente 'K,' houve pouca absorção pelas plantas mantidas em solo infestado, independentemente do tratamento bacteriano quando comparadas àquelas plantas mantidas em vaso com inoculo e sem microbiolização (Tab. 7).

Em relação aos micronutrientes, as diferenças foram muito pequenas entre os tratamentos cujo solo não foi autoclavado. Porém, pode-se destacar menores concentrações de 'Cu' quando as figueiras foram microbiolizadas principalmente com os isolados F71, F75, F76, FB27, FB62 e FB68. Com relação ao 'S', maior concentração no solo, foi observada nos tratamentos com todas as bactérias isoladas de folhelhos betuminoso, Fato interessante, visto que, o enxofre elementar é um co- produto produzido na extração de óleo de rochas de folhelhos betuminosos, ambiente de onde as bactérias foram isoladas. A concentração de 'S' também foi maior que a testemunha nos isolados de figueira F64, F71 e F75 (Tab. 7).

Tabela 6 - Efeito do tratamento de mudas de figueira com rizobactérias sobre parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plantas e reprodução de *Meloidogyne incognita*.

Trat.	FR	% controle	NG**	MFR	NF	MSF	AF	CA	CB	CT	PO	PFO	FA
											(UE.min ⁻¹ .mg ⁻¹ de tecido)		(g/100g)
F08	21,94 abcd	20,62 ^{ns}	80,00 ef*	9,81 de	5,66 ab	1,20 bcd	257,06 bcdef	14,38 abcde	3,36 abc	17,74 bcde	0,104 d	0,175 d	2,38 bcdef
F25	14,15 f	48,80 ¹	77,83 ef	5,94 f	4,83 abc	1,05 bcde	212,73 efg	15,30 abcd	3,66 abc	18,97 ab	0,120 cd	0,199 cd	2,30 cdef
F64	24,46 abc	11,50 ^{ns}	98,50 de	14,72 b	5,16 abc	1,24 bcd	280,84 bcd	14,78 abcde	3,66 abc	18,45 abc	0,137 bcd	0,235 bc	2,52 abcdef
F71	21,28 bcd	23,01 ^{ns}	111,16 cde	9,86 de	5,66 ab	1,04 bcd	223,99 defg	14,02 bcd	3,25 bc	17,27 bcde	0,159 abc	0,281 a	2,27 def
F75	26,10 ab	5,57 ^{ns}	128,50 cd	10,65 cde	4,83 abc	0,75 e	307,56 b	15,50 abc	3,66 abc	19,17 ab	0,140 bcd	0,228 bc	2,18 f
F76	16,78 def	39,29 ¹	118,67 cd	10,69 cde	4,33 bc	0,97 cde	204,44 fg	15,80 ab	3,77 ab	19,57 ab	0,171 abc	0,166 d	2,38 bcdef
F78	14,90 ef	46,09 ¹	213,60 a	13,29 bc	5,33 ab	0,75 e	283,88 bcd	16,71 a	4,12 a	20,84 a	0,199 a	0,265 ab	2,20 ef
FB27	22,09 abcd	20,07 ^{ns}	152,50 bc	10,63 cde	6,00 ab	1,36 b	288,21 bc	14,46 abcde	3,40 abc	17,86 bcde	0,153 abcd	0,168 d	2,52 abcdef
FB34	20,53 bcd	25,72 ¹	182,00 ab	9,43 de	4,50 abc	0,95 de	190,03 g	14,79 abcde	3,56 abc	18,46 abc	0,161 abc	0,170 d	2,65 abcd
FB39	22,59 abc	18,35 ^{ns}	140,50 bc	11,24 cd	3,66 c	1,00 cde	237,15 cdefg	12,36 e	2,86 c	15,22 e	0,167 abc	0,181 d	2,80 ab
FB59	19,71 cde	28,69 ¹	109,00 cde	7,665 ef	5,00 abc	1,00 cde	230,69 cdefg	13,10 cde	3,03 bc	16,13 cde	0,152 abcd	0,195 cd	2,60 abcde
FB60	22,17 abcd	19,79 ^{ns}	57,00 f	6,276 f	5,16 abc	1,21 bcd	284,73 bcd	12,66 e	2,91 c	15,56 de	0,127 cd	0,200 cd	2,83 a
FB62	24,68 abc	10,70 ^{ns}	124,00 cd	10,17 de	5,16 abc	1,17 bcd	270,96 bcde	13,94 bcde	3,27 bc	17,21 bcde	0,117 cd	0,235 bc	2,68 abcd
FB68	25,94 ab	6,15 ^{ns}	122,67 cd	9,96 de	6,16 a	1,315 bc	270,93 bcde	14,71 abcde	3,47 abc	18,19 abcde	0,183 ab	0,201 cd	2,49 abcdef
TSA***	0,00 g	-	0,00 f	35,36 a	5,83 ab	2,38 a	466,99 a	16,69 a	4,09 a	20,78 a	0,104 d	0,287 a	2,36 cdef
TSI****	27,64 a	-	141,80bc	11,74 cd	5,83 ab	1,24 bcd	271,76 bcde	12,86 de	3,04 bc	15,89 cde	0,167 abc	0,200 cd	2,70 abc
CV%	21,28		13,70	20,01	23,24	21,30	16,78	12,98	17,03	11,55	27,00	15,38	12,54

NG: número de galhas, FR: fator de reprodução de *M. incognita*, MFR: Massa fresca da raiz, NF: número de folhas, MSF: massa seca das folhas, AF: área foliar, CA: clorofila A, BC: clorofila B, CT: clorofila total, PO: peroxidase, PFO: polifenoloxidase, FA: Fenóis extraíveis em água, ns- não significativo; 1- significativo a 5%.

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; **Valores originais transformados em $\sqrt{x+1}$;

***TSA: testemunha em solo autoclavado;

****TSI testemunha em solo naturalmente infestado tratado com solução salina.

Tabela 7 - Efeito dos tratamentos bacterianos sobre características do solo.

Trat.	pH H ₂ O		P (mg/L)		K (mg/L)		M.O. (%)		Al (cmolc/L)		Ca (cmolc/L)		Mg (cmolc/L)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F08	4,3	4,7	403,9	174,3	240	152,0	1,8	2,0	1,0	0,4	2,47	3,11	0,52	1,03
F25	4,3	4,8	403,9	192,5	240	160,0	1,8	2,1	1,0	0,3	2,47	4,17	0,52	1,37
F64	4,3	4,7	403,9	192,5	240	164,0	1,8	2,2	1,0	0,5	2,47	2,83	0,52	1,06
F71	4,3	4,7	403,9	203,6	240	172,0	1,8	2,2	1,0	0,5	2,47	2,92	0,52	1,14
F75	4,3	4,6	403,9	182,8	240	188,0	1,8	2,0	1,0	0,6	2,47	2,95	0,52	1,14
F76	4,3	5,0	403,9	192,5	240	148,0	1,8	2,2	1,0	0,5	2,47	2,84	0,52	1,00
F78	4,3	4,8	403,9	174,3	240	168,0	1,8	2,3	1,0	0,4	2,47	3,85	0,52	1,21
FB27	4,3	4,8	403,9	203,6	240	180,0	1,8	2,1	1,0	0,5	2,47	3,03	0,52	1,20
FB34	4,3	4,8	403,9	203,6	240	180,0	1,8	2,3	1,0	0,5	2,47	3,14	0,52	1,16
FB39	4,3	4,7	403,9	203,6	240	200,0	1,8	2,2	1,0	0,6	2,47	2,87	0,52	1,11
FB59	4,3	4,7	403,9	192,5	240	188,0	1,8	2,4	1,0	0,7	2,47	3,12	0,52	1,16
FB60	4,3	4,8	403,9	192,5	240	176,0	1,8	2,2	1,0	0,6	2,47	2,85	0,52	1,05
FB62	4,3	4,6	403,9	192,5	240	192,0	1,8	2,3	1,0	0,5	2,47	2,85	0,52	1,16
FB68	4,3	4,7	403,9	192,5	240	204,0	1,8	2,5	1,0	0,6	2,47	3,11	0,52	1,23
TSA*	4,7	4,7	481,9	153,5	312	96,0	2,0	2,1	0,4	0,6	3,13	3,47	0,88	1,09
TSI**	4,3	4,7	403,9	203,6	240	164,0	1,8	2,2	1,0	0,5	2,47	3,48	0,52	1,09

continuação Tab.. 7.

Teor de micronutrientes										
Trat.	Zn (mg/L)		Cu (mg/L)		S (mg/L)		B (mg/L)		Mn (mg/L)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F08	3,9	4,48	22,6	20,23	9,0	16,0	0,4	0,3	31,6	36,3
F25	3,9	4,79	22,6	19,23	9,0	18,0	0,4	0,1	31,6	41,4
F64	3,9	4,14	22,6	15,93	9,0	25,0	0,4	0,3	31,6	40,9
F71	3,9	4,30	22,6	16,13	9,0	24,0	0,4	0,3	31,6	43,1
F75	3,9	4,67	22,6	17,46	9,0	22,0	0,4	0,4	31,6	44,4
F76	3,9	4,21	22,6	16,19	9,0	19,0	0,4	0,3	31,6	45,2
F78	3,9	4,75	22,6	22,11	9,0	17,0	0,4	0,4	31,6	41,9
FB27	3,9	4,49	22,6	16,68	9,0	22,0	0,4	0,3	31,6	45,1
FB34	3,9	4,93	22,6	18,41	9,0	23,0	0,4	0,4	31,6	43,3
FB39	3,9	4,96	22,6	24,38	9,0	22,0	0,4	0,3	31,6	44,2
FB59	3,9	5,14	22,6	19,27	9,0	24,0	0,4	0,4	31,6	44,3
FB60	3,9	4,49	22,6	19,44	9,0	22,0	0,4	0,3	31,6	41,0
FB62	3,9	4,85	22,6	17,57	9,0	26,0	0,4	0,2	31,6	42,7
FB68	3,9	4,76	22,6	17,02	9,0	24,0	0,4	0,3	31,6	45,0
TSA*	4,8	4,95	21,4	20,82	40,0	18,0	0,4	0,8	88,8	78,9
TSI**	3,9	4,83	22,6	23,97	9,0	18,0	0,4	0,1	31,6	41,5

TSA* Testemunha em solo autoclavado

TSI** Testemunha em solo naturalmente infestado

Embora a inibição da reprodução do nematoide, a redução do número de galhas e aumento da massa fresca de raiz tenham sido pequenas nas plantas microbiolizadas comparativamente a testemunha com nematoides e sem tratamento bacteriano, observa-se que o teor de clorofila nas plantas tratadas com o isolado F78 foi semelhante as testemunhas desenvolvidas em solo autoclavado e superior à testemunha inoculada não microbiolizada (Tab. 6).

As plantas microbiolizadas com o isolado F78 também apresentaram maior atividade da peroxidase, diferindo de todos demais tratamentos (Tab. 6). Em relação a atividade da polifenoloxidase, no tratamento das figueiras com F78, observou-se valores próximos a testemunha em solo autoclavado, porém o tratamento F71 foi aquele, que resultou em maior atividade da dessa enzima, não diferindo da testemunha não inoculada e mantida em solo autoclavado ($P < 0,05$) (Tab. 6).

Observou-se correlação negativa ($P < 0,05$) entre fator de reprodução de *M. incognita* com a massa fresca da raiz e com os teores de clorofila (A, B e total) apenas no tratamento cujas plantas foram inoculadas e não microbiolizadas (Tab. 8). Além disso, verificou-se correlação negativa significativa no tratamento F78, entre fator de reprodução do nematóide e os fatores massa foliar e concentração de fenóis (Tab. 8).

Em contrapartida, nas plantas microbiolizadas com F76, verificou-se correlação positiva entre fator de reprodução e área foliar, assim como teor de clorofila (A, B e total) (Tab. 8).

Tabela 8 - Coeficiente de correlação entre fator de reprodução de *M. incognita* e número de galhas, Massa fresca da raiz, número de folhas, massa seca das folhas, área foliar, clorofila A, clorofila B, clorofila total, peroxidase e polifenoloxidase.

Trat.	Coeficientes de correlação								
	MFR	MSF	AF	CA	CB	CT	PO	PFO	FA
F08	0.60 ^{ns}	0.34 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	-0.47 ^{ns}	-0.50 ^{ns}	-0.47 ^{ns}	-0.48 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0,02 ^{ns}
F25	0.53 ^{ns}	0.43 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.11 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.22 ^{ns}
F64	0.67 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.49 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.46 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.26 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	0.39 ^{ns}
F71	-0.24 ^{ns}	-0.17 ^{ns}	0.49 ^s	-0.36 ^{ns}	-0.30 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.12 ^{ns}	-0.54 ^{ns}
F75	0.70 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.14 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	-0.34 ^{ns}	-0.34 ^{ns}	-0.65 ^{ns}	-0.35 ^{ns}	-0,34 ^{ns}
F76	0.18 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.81 [*]	-0.90 ^{**}	-0.88 [*]	-0.90 ^{**}	0.42 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.54 ^{ns}
F78	-0.44 ^{ns}	-0.94 [*]	-0.47 ^{ns}	0.60 ^{ns}	0.61 ^{ns}	0.86 [*]	-0.65 ^{ns}	-0.46 ^{ns}	-0,86 [*]
FB27	FR	0.60 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.53 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	-0.11 ^{ns}	0.51 ^{ns}	0.44 ^{ns}
FB34		0.33 ^{ns}	0.86 [*]	0.81 [*]	-0.03 ^{ns}	-0.32 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.75 [*]
FB39		0.63 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.49 ^{ns}	-0.53 ^{ns}	-0.53 ^{ns}	-0.53 ^{ns}	-0.41 ^{ns}	-0.18 ^{ns}
FB59		0,59 ^{ns}	0.78 [*]	-0.04 ^{ns}	0.44 ^{ns}	0.39 ^{ns}	0.43 ^{ns}	-0.80 [*]	-0.33 ^{ns}
FB60		0.45 ^{ns}	0.22 ^{ns}	0.19 ^{ns}	-0.25 ^{ns}	-0.26 ^{ns}	-0.26 ^{ns}	0.87 [*]	-0.23 ^{ns}
FB62		0.25 ^{ns}	0.76 [*]	0.09 ^{ns}	0.81 [*]	0.78 [*]	0.80 [*]	0.35 ^{ns}	-0.02 ^{ns}
FB68		0.56 ^{ns}	-0.39 ^{ns}	-0.67 ^{ns}	0.83 [*]	0.84 [*]	0.83 [*]	0.07 ^{ns}	0.70 [*]
TSI****		-0.79 [*]	0.21 ^{ns}	0.35 ^{ns}	-0.79 [*]	-0.90 [*]	-0.82 [*]	0.20 ^{ns}	-0.55 ^{ns}

MFR: Massa fresca da raiz, , MSF: massa seca das folhas, AF: área foliar, CA: clorofila A, BC: clorofila B, CT: clorofila total, PO: peroxidase, PFO: polifenoloxidase, FA: Fenóis extraíveis em água. TSI***; ns- não significativo; *P<0,05; **P<0,001.

Além dos aspectos já descritos, os danos pelo nematoide das galhas são facilmente observados comparando o aspecto visual das raízes das plantas infestadas e não infestadas (Fig. 10)

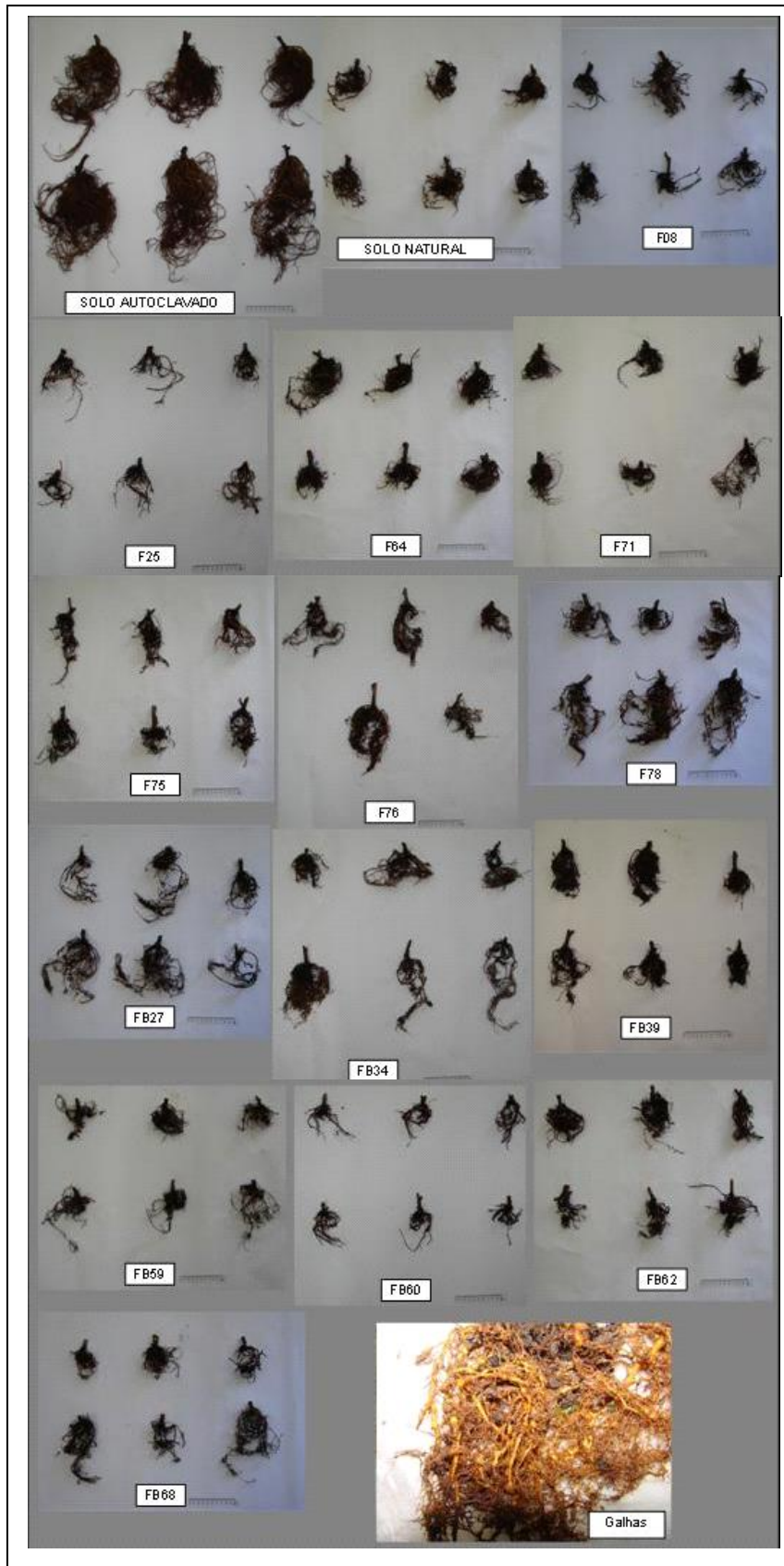


Figura 10 - Aspecto das raízes de figueira nos diferentes tratamentos bacterianos e detalhe das galhas ocasionadas por *Meloidogyne incognita* em figueira.

Observou-se também, que o tratamento de plantas de figueira com bactérias interferiu na nematofauna do solo. De modo geral, constatou-se uma níveis populacionais de *Helicotylenchus* sp. em todos tratamentos, além disso, alguns isolados tiveram efeito negativo, reduzindo populações não alvo (nematoides de vida livre) e estimulando nematoides fitopatogênicos do gênero *Helicotylenchus* (Fig. 11).

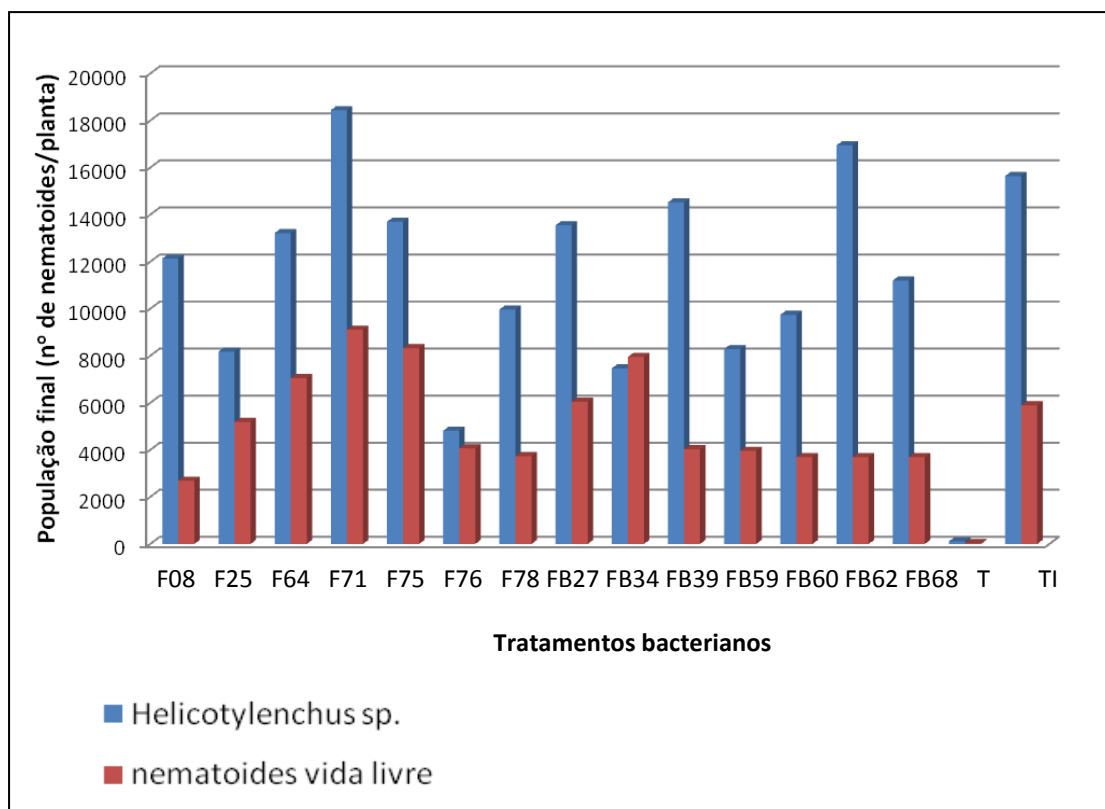


Figura 11 - Populações de nematoides encontradas em solo de figueira submetida a diferentes tratamentos bacterianos.

Entre estes, o tratamento das figueiras com os isolados F71 e FB62 promoveu aumento do fator de reprodução de *Helicotylenchus* spp. comparativamente a testemunha em solo infestado. O isolado F71 também estimulou também o aumento das populações de nematoides de vida livre, enquanto F08, F76, F78, FB39, FB59, FB60, FB62 e FB68 tiveram efeito negativo sobre esse grupo de nematoides benéficos (Fig. 11) interferindo negativamente sobre a reprodução dos nematoides de vida livre (Fig. 12).

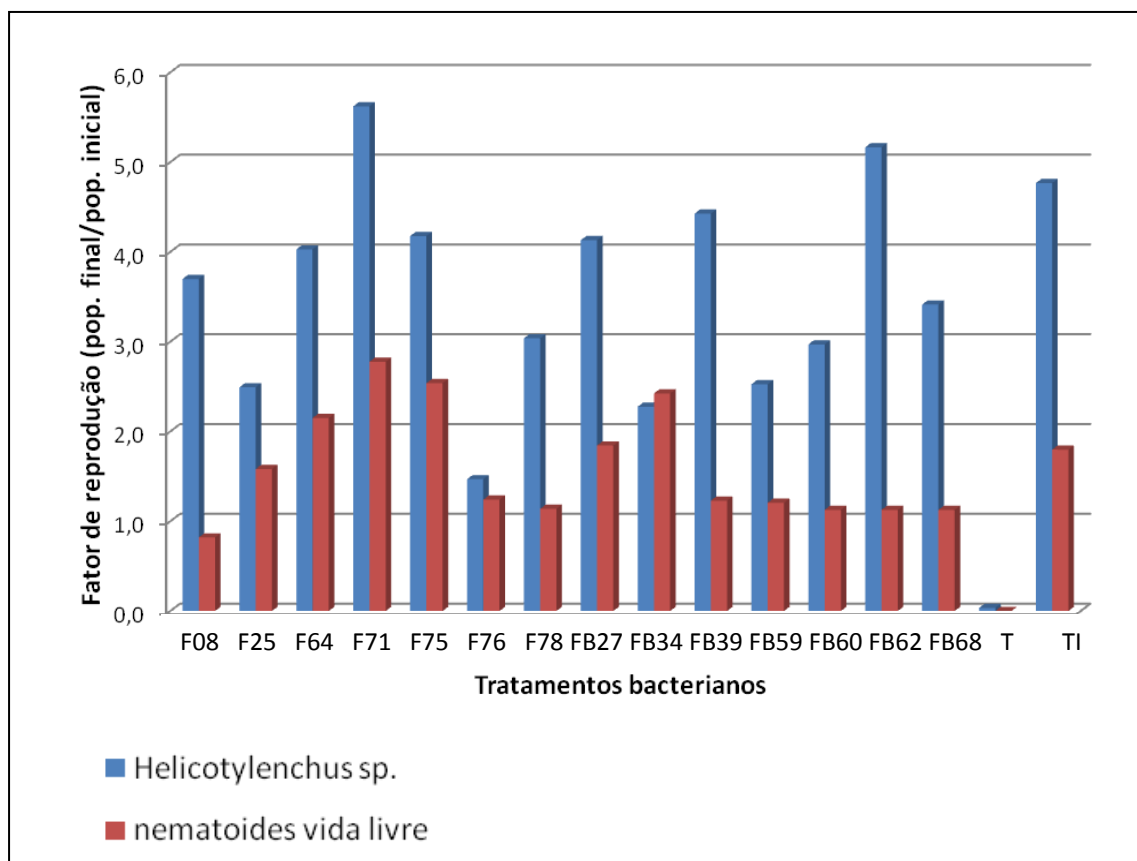


Figura 12 - Fator de reprodução de nematoides encontradas em solo de figueira submetida a diferentes tratamentos bacterianos.

3.3.2 Potencial de isolados bacterianos no tratamento de solo visando o controle de *Meloidogyne incognita* em figueira cv. Roxo de Valinhos

Avaliando-se o efeito biocontrolador dos isolados bacterianos F78 e F75, verificou-se que apesar de não haver diferença quanto ao número de galhas entre os tratamentos e a testemunha não microbiolizada, ocorreu redução de 20 a 43% da reprodução de *M. incognita* naquelas figueiras cujo solo foi tratado com esses biocontroladores ($P < 0,05$).

De forma geral, as plantas desenvolvidas em solo infestado, apresentaram menor volume e peso de raízes, e sintomas reflexos na parte aérea, incluindo folhas amareladas com redução no teor de clorofila A, B e Total, bem como, redução da área foliar, massa foliar e no número de folhas (Fig. 9; Tab. 13). Os impactos da infestação de *M. incognita* sobre as plantas são visíveis, principalmente nas raízes da planta, caracterizando a agressividade dessa praga em figueira. No entanto, houve um pequeno incremento da massa seca das folhas nos tratamentos bacterianos comparativamente a testemunha inoculada (Tab. 9).

Tabela 9 - Efeito do tratamento do solo com rizobactérias sobre o desenvolvimento de plantas de figueira e reprodução do nematoide das galhas (NG: número de galhas, FR: fator de reprodução de *M. incognita*, MFR: Massa fresca da raiz, NF: número de folhas, MSF: massa seca das folhas, AF: área foliar, CA: clorofila A, BC: clorofila B, CT: clorofila total, PO: enzima peroxidase, PFO: enzima polifenoloxidase; FA: Fenóis extraíveis em água).

Trat.	FR	Controle (%)	NG**	MFR (g)	AF (cm)	NF	MSF (g)	CA	CB	CT	PO	PFO	FA
											(UE.min ⁻¹ .mg ⁻¹ de tecido)		(g/100g)
F75	10,24b*	20,44 ¹	181,33a	12,70b	146,42b	4,16b	1,26b	11,52c	2,64c	14,15c	0,12b	0,22b	3,01a
F78	7,32c	43,11 ¹	269,8a	16,28b	138,73b	4,83b	1,27b	14,75b	3,47b	18,22b	0,15a	0,23b	2,82a
TSA***	0,00d	100,00	0,00b	35,19a	466,99a	7,16a	2,38a	16,69a	4,09a	20,78a	0,10b	0,29a	2,36b
TSI****	12,88 ^a	0,00	217,5a	12,55b	139,68b	4,16b	0,63c	13,98b	6,58b	14,15c	0,12b	0,19b	2,34b
CV(%)	8,63	-	25,62	19,00	35,57	26,14	22,87	8,78	10,84	9,37	27,17	14,20	9,44

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; 1- significativo a 5%.

**Valores originais transformados em $\sqrt{x+1}$;

***TSA: testemunha em solo autoclavado;

****TSI testemunha em solo naturalmente infestado tratado com solução salina.



Figura 13 - Aspecto visual das raízes de figueira nos diferentes tratamentos: solo autoclavado não tratado; solo natural mente infestado com fitonematoides; e: F78 e F75 - raízes provenientes de solo tratado com bactérias.

Além disso, também foi observado que o tratamento do solo com os isolados F75 e F78, favoreceu a multiplicação de *Helicotylenchus* spp. (Tab. 9) diferindo dos resultados encontrados quando as mudas de figueira foram apenas microbiolizadas com essas mesmas bactérias (Fig. 13).

Tabela 10 - Efeito do tratamento do solo com rizobactérias sobre a nematofauna do solo.

Tratamento	<i>M. incognita</i>		<i>Helicotylenchus</i> sp.		Nematoides vida-livre	
	Pop. final	FR	Pop.final	FR	Pop. final	FR
F75	91430,19 b	10,23 b	8418,66 b	2,56 b	1424,76 c	0,41 c
F78	65379,55 c	7,32 c	11243,55 a	3,43 a	2240,00 b	0,64 b
TSI***	114999,1 a	12,88 a	5550,22 c	1,68 c	3341,33 a	0,97 a
TSA**	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 d	36,92 d	0,00 d
CV%	8,63*	8,63*	15,78*	16,34*	21,29*	21,52*

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade; **TSA: testemunha em solo autoclavado;***TSI testemunha em solo naturalmente infestado tratado com solução salina.

Em relação ao efeito dos tratamentos do solo, sobre os nematoides de vida livre, ambos os isolados afetaram negativamente a reprodução desses organismos comparativamente a testemunha, conforme valores de população final e de FR apresentados na Tabela 10.

Quanto às características químicas do solo cultivado com figueira (Tab. 13), maior concentração de Al, Ca, Mg, B e Mg foram observadas no solo autoclavado, cinco meses após os o plantio das mudas; no entanto, macronutrientes como K e P e os micronutrientes Cu, Zn, B e Al apresentaram redução nesse mesmo tratamento.

Embora os isolados F75 e F78 não tenham proporcionado aumento do peso de raízes em relação à testemunha inoculada e não microbiolizada, maiores níveis de K foram verificados no solo desses tratamentos, o que pode ter contribuído para um maior peso de folhas das figueiras. No entanto, para o isolado F78, observou-se correlação positiva altamente significativa entre o FR do nematoide e a massa fresca de raiz (Tab. 11).

Os índices de clorofila (a, b e total) foram significativamente inferiores em plantas parasitadas por *M. incognita* quando comparadas às plantas desenvolvidas em solo autoclavado (Tab. 9). Contudo, a redução foi menor em plantas desenvolvidas em solo previamente tratado com o isolado F78 comparativamente à testemunha infectada com o nematoide e não tratada. Da mesma forma, as figueiras provenientes desse mesmo tratamento apresentaram maior atividade enzimática de peroxidase (Tab. 9), sendo os valores observados, correlacionados positivamente com os dados de FR do nematoide no mesmo tratamento; fato esse observado para as figueiras submetidas ao tratamento do solo com o isolado F75, cujo fator de reprodução de *M. incognita* também correlacionou-se negativamente com os

respectivos níveis de peroxidase (Tab. 11). Além disso, maiores níveis de compostos fenólicos, foram encontrados nas plantas provenientes do tratamento do solo com F78 e também com F75, muito embora não tenha sido observado correlação entre fator de reprodução do nematóide e compostos fenólicos (Tab. 9, Tab. 11).

Tabela 11 - Coeficiente de correlação entre fator de reprodução de *M. incognita* e massa fresca da raiz (MFR), massa seca das folhas (MSF), área foliar (AF), clorofila (CA), clorofila B (CB), clorofila total (CT), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PFO).

. Trat.	Coeficientes de correlação (R)								
	MFR	MSF	AF	CA	CB	CT	PO	PFO	FA
F75	0.34 ^{ns}	-0.36 ^{ns}	-0.46 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0.72*	0.14 ^{ns}	-0.01 ^{ns}
F78	-0.97**	0.34 ^{ns}	-0.76*	-0.41 ^{ns}	0.17 ^{ns}	-0.19 ^{ns}	0.76*	-0.29 ^{ns}	0.70 ^{ns}
TSI****	-0.47 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.53 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.43 ^{ns}	0.31 ^{ns}	-0.69 ^{ns}

MFR: Massa fresca da raiz, , MSF: massa seca das folhas, AF: área foliar, CA: clorofila A, BC: clorofila B, CT: clorofila total, PO: peroxidase, PFO: polifenoloxidase, FA: Fenóis extraíveis em água; TSI***; ns- não significativo; *P<0,05; **P<0,001

Tabela 13 - Influencia dos tratamentos nas características do solo.

Trat.	P (mg/L)		K (mg/L)		M.O. (%)		Al (cmolc/L)		Ca (cmolc/L)		Mg (cmolc/L)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F75	403,9	253,8	240	220,0	1,8	2,3	1,0	1,2	2,47	2,88	0,52	0,79
F78	403,9	233,0	240	216,0	1,8	2,3	1,0	1,1	2,47	2,76	0,52	0,75
TSA*	481,9	153,5	312	96,0	2,0	2,1	0,4	0,6	3,13	3,47	0,88	1,09
TSI**	403,9	253,8	240	188,0	1,8	2,2	1,0	1,2	2,47	2,71	0,52	0,69

Trat.	Zn (mg/L)		Cu (mg/L)		S (mg/L)		B (mg/L)		Mn (mg/L)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
F75	3,9	5,37	22,6	30,57	1,8	2,3	1,0	1,2	2,47	2,88
F78	3,9	5,75	22,6	28,30	1,8	2,3	1,0	1,1	2,47	2,76
TSA*	3,9	4,95	22,6	20,82	2,0	2,1	0,4	0,6	3,13	3,47
TSI**	3,9	5,16	22,6	27,64	1,8	2,2	1,0	1,2	2,47	2,71

Analisando os resultados apresentados, de forma geral, todos os tratamentos em solo infestado por *M. incognita* apresentaram elevado número de galhas e plantas com sistema radicular bastante debilitado. Os dados encontrados nesse estudo corroboram referências anteriores (CARNEIRO; MAZZAFERA; FERRAZ, 1999), demonstrando o potencial de danos de *M. incognita* para a figueira e ressaltando a importância do controle desse fitopatógeno no desenvolvimento da cultura.

Percebe-se que o parasitismo por *M. incognita* altera aspectos fisiológicos da planta como a atividade da enzima polifenoloxidase (Tab. 6, Tab. 9) e a concentração de fenóis (Tab. 9) envolvidas no processo de resistência a patógenos (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Em relação à atividade de peroxidase, é observado um aumento desta na presença do parasita, no primeiro experimento (Tab. 6), que pode ser explicado pelo envolvimento dessas enzimas na defesa de plantas a patógenos, visto que, peroxidases são componentes da resposta inicial da defesa de plantas contra o ataque de patógenos (TUZUN, 2001). Em contrapartida, no segundo experimento, observa-se a redução da concentração de fenóis nas testemunhas em solo infestado (Tab. 9). Essa redução pode estar relacionada ao aumento da peroxidase e da polifenoloxidase, que atuam catalizando a oxidação dos fenóis (CAMPOS; SILVEIRA, 2003) como constatado nas plantas microbiolizadas com o isolado F78, no primeiro experimento, que apresentaram maior atividade de peroxidase e menor concentração de fenóis em relação aos demais tratamentos (Tab. 6).

No segundo experimento, ambos isolados utilizados no tratamento do solo proporcionaram um aumento na concentração de fenóis nas plantas (Tab. 9). Esses compostos são um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila, frequentemente solúveis em água que são reconhecidos por suas propriedades fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (STANGARLIN *et al.*, 2011) e podem estar envolvidos em mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência a doenças por plantas (NICHOLSON, 1995)

Além disso, alguns compostos fenólicos possuem efeito nematicida (STADLER; DAGNE; ANKE, 1994; KANAGY, KAYA, 1996; VOUYOUKALOU; STEFANOUDAKI, 1998).

Ainda em relação ao parasitismo de *M. incognita*, observou-se que as alterações ocasionadas nas raízes refletem diretamente na parte aérea, resultando

na redução do teor de clorofila e comprometimento das suas funções vitais. A massa das folhas, área foliar e teor de clorofila diferem significativamente ($P < 0,05$) entre as testemunha inoculada e não inoculada (Tab. 6, Tab. 9).

Entre as alterações radiculares ocasionadas por *M. incognita* observou-se redução significativa na capacidade de absorção de nutrientes, ao comparar figueiras plantadas em solo infestado e em solo autoclavado. Dessa forma, verificou-se que macronutrientes importantes para o desenvolvimento das plantas como K e P, foram utilizados de forma mais intensa pelas plantas não infestadas, resultando em maior peso de raiz e parte aérea e menores níveis desses nutrientes no solo ao fim do experimento, enquanto tratamentos onde havia *M. incognita* apresentaram níveis mais elevados de K e P ao final do experimento (Tab. 7, Tab. 13).

Os elevados níveis de Fósforo, constatados no solo empregado nos dois experimentos, sugerem a realização de adubações frequentes no pomar de onde o solo foi extraído provavelmente utilizadas pelo produtor para tentar compensar a alta infestação do nematoide na área. Segundo Medeiros (2002) as práticas culturais como a adubação, são muito utilizadas pelos produtores e podem contribuir para o manejo do nematóide reduzindo a severidade da doença, porém, o custo dessas técnicas é alto e muitas vezes incompatível com os lucros do produtor.

Além disso, segundo Carneiro e colaboradores (1999) a alta atividade metabólica das células gigantes durante a alimentação de *Meloidogyne* sp. provoca a mobilização dos fotoassimilados da parte aérea para a raiz, contribuindo para menor desenvolvimento das plantas, principalmente na fase de reprodução do nematoide quando as fêmeas demandam maiores quantidades de nutrientes para formação dos ovos. Esse fenômeno foi estudado por Dorhout *et al.* (1993) que acompanharam o processo de translocação do floema e acúmulo de fotoassimilados nas células gigantes, aplicando corante fluorescente nas folhas de tomateiro, concluindo que *M. incognita* atua como um dreno metabólico.

Outra consequência do parasitismo pelo nematóide das galhas, verificada nas figueiras plantadas em solo infestado, foi à redução significativa do teor de clorofila, com exceção das mudas tratadas pelo isolado F78, constatou-se que todos os tratamentos apresentaram índices de clorofila inferiores as testemunhas em solo autoclavado (Tab. 6, Tab. 9).

De forma semelhante, diversos estudos relacionam o parasitismo de *Meloidogyne* spp. à redução da atividade fotossintética (MELAKEBERHAN *et al.*,

1986; ASMUS; FERRAZ, 2001). Bird (1974) considerou que esse decréscimo fotossintético pode estar relacionado a diminuição na absorção de gás carbônico, pois os danos radiculares e a conseqüente redução na absorção de água pelas raízes, fazem com que a planta responda tentando evitar perdas de água, ocasionando o fechamento parcial dos estômatos e reduzindo as trocas gasosas. Porém outros fatores são sugeridos, como: redução do teor de clorofila (NAGESH; DHAWAN, 1988), mudanças na condutância estomática (SAEED *et al.*, 1997.), limitações fotoquímicas (SCHANS; ARNTZEN, 1991), desequilíbrio de nutrientes (WALLACE, 1974) e a interferência sobre a síntese e a translocação de fatores reguladores fotossíntese produzidos nas raízes (LOVEYS; BIRD, 1973).

Muitos autores relacionam as alterações fisiológicas causadas por *M. incognita* aos níveis populacionais deste fitoparasita (ABRAO; MAZZAFERA, 2001), nesse sentido, a análise de correlação entre fator de reprodução e demais aspectos avaliados, foi negativa para massa fresca da raiz em vários tratamentos, contudo essa correlação foi significativa ($P < 0,05$) nas testemunhas não tratadas com bactérias e em solo naturalmente infestado. Também observou-se correlação negativa ($P < 0,05$) entre fator de reprodução de *M. incognita* os teores de clorofila (A, B e total) apenas no tratamento cujas plantas foram inoculadas e não microbiolizadas (Tab. 8).

Em contrapartida, nas plantas microbiolizadas com F76, verificou-se correlação positiva entre fator de reprodução e área foliar, assim como teor de clorofila (A, B e total) (Tab. 8).

Quanto ao controle de *M. incognita* em figueira, embora nenhum dos isolados tenha proporcionado inibição maior que 50% da reprodução do nematoide, em geral, todos os tratamentos apresentaram valores do fator de reprodução do nematóide inferiores a testemunha sem tratamento bacteriano, nos dois experimentos. Assim, maiores níveis de controle foram obtidos com a microbiolização das figueiras com as bactérias F25 (não identificada), F78 (*Streptomyces* sp.) e F76 (*Streptomyces* sp.) cuja redução do fator de reprodução ($P < 0,05$) variou entre 49 e 39% (Tab. 6).

Em trabalho semelhante, utilizando rizobactérias de diferentes fontes, Santos *et al.* (2006) observaram reduções em até 80 % do fator de reprodução de *M. incognita* pela microbiolização de figueiras com rizobacterias, nesse estudo os autores realizaram reaplicação das rizobactérias na véspera da infestação com o

nematóide e solo autoclavado, o que pode ter contribuído para obtenção de níveis mais altos de controle.

Resultados semelhantes aos constatados no tratamento de mudas de figueira com o isolado F78, foram obtidos no segundo experimento, onde o tratamento F78 reduziu em 43% a reprodução de *M. incognita*, quando aplicado no solo, em relação à testemunha em solo infestado (Tab. 9).

Contudo, em ambos os experimentos, a redução do fator de reprodução na maioria dos tratamentos não refletiu de forma significativa na redução de danos à planta, avaliada nos quesitos: massa fresca de raiz, massa fresca das folhas e número de galhas (Tab. 6, Tab. 9).

Apesar da maioria dos tratamentos bacterianos não proporcionar uma redução significativa no número de galhas, a redução no fator de reprodução de *M. incognita*, constatada em todos os tratamentos bacterianos (Tab. 6; Tab. 9), indica que as bactérias selecionadas interferem no ciclo de vida do nematoide, resultando em menor número de ovos por raiz, menor número de juvenis no solo, menor população final e fator de reprodução de *M. incognita* final em relação às testemunhas em solo infestado pelo respectivo nematóide.

Nesse sentido, Abraão e Mazzfera (2001) ressaltam a importância de realizar experimentos utilizando-se vários níveis populacionais de *M. incognita*. Segundo os autores, na maioria dos trabalhos utilizam-se níveis de inóculo muito elevados os quais podem prejudicar a avaliação de aspectos fisiológicos relacionados a resistência de plantas a doença e levar à subestimação do sucesso do controle do patógeno. Um exemplo, citado pelos mesmos autores é o estudo de resistência de plantas de canola a *M. incognita* e *M. javanica*, onde as plantas que receberam 12.500 ovos dessas espécies, apresentaram índice de galhas igual ao de plantas que receberam 2.500 ovos (FERRAZ e ROSSI, 1999). Dessa forma, as observações de Abraão e Mazzfera (2001), citadas anteriormente, sobre a utilização de níveis altos de inóculo, justificam a ausência de correlação significativa entre vários aspectos estudados e o fator de reprodução de *M. incognita* e reforçam a importância novos estudos avaliando os biocontroladores aqui testados em vários níveis populacionais do nematóide.

Apesar da necessidade de novos estudos para avaliar o potencial dos biocontroladores testados, foi possível perceber, através dos resultados aqui apresentados, que o isolado F78 foi o mais promissor, pois, além de reduzir a

reprodução de *M. incognita* quando utilizado para o tratamento de mudas, também controlou o patógeno quando aplicado no tratamento do solo.

Além disso, F78 interferiu também na atividade da peroxidase, diferindo de todos demais tratamentos e apresentou, também, atividade da polifenoloxidase próxima a testemunha em solo autoclavado, o que pode contribuir para a indução de resistência (CONRATH *et al.*, 2002), fato esse que corrobora diversos relatos de indução de resistência a fitopatógenos por *Streptomyces* sp. (MACAGNANI *et al.*, 2008; TARKKA *et al.*, 2008; LEHR *et al.*, 2008; CONN *et al.*, 2008). Esses resultados são importantes, pois as peroxidases estão envolvidas na modificação estrutural das paredes celulares, contribuindo para o aumento da rigidez que está relacionado ao incremento da resistência química e mecânica desta, enquanto a polifenoloxidase provavelmente interfere no processo de resistência através da oxidação de compostos fenólicos a quinonas, substâncias altamente tóxicas aos micro-organismos (CAMPOS, SILVEIRA, 2003).

Outra observação importante, diz respeito ao método empregado para aplicação dos biocontroladores. Comparando-se os resultados obtidos pelo isolado F78, quando foi utilizado no tratamento de mudas ou tratamento de solo, observa-se que o seu emprego no tratamento de mudas foi mais eficiente do que a aplicação do biocontrolador no tratamento do solo, considerando aspectos como fator de reprodução do nematoide, número de galhas e teor de clorofila nas plantas (Tab. 6, Tab. 9).

Organismos do gênero *Streptomyces*, como o isolado F78, são quantitativamente e qualitativamente importantes na rizosfera das espécies vegetais, pois são capazes de influenciar o crescimento de plantas e proteger as raízes de patógenos (TARKKA; HAMPP, 2008). A supressão de doenças por estreptomicetos pode estar relacionada a vários mecanismos como produção de compostos antimicrobianos, nematicidas e de enzimas (WELLER *et al.*, 2002). Esses mecanismos foram observados no capítulo 1, onde índices de mortalidade acima de 95% foram observados em juvenis de segundo estágio de *M. incognita* tratados com streptomicetos.

Existem muitos relatos sobre o potencial de estreptomicetos no manejo de fitonematoides, inclusive para de *M. incognita* (SOUSA *et al.*, 2006; YOON *et al.*, 2012; RUANPANUN, 2011). *Streptomyces* spp. são considerados os actinomicetos mais promissores no controle de fitonematoides, principalmente devido a produção

de metabólitos nematocidas (DICKLOW *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 1987; SAMAC; KINDEL 2001; SUN *et al.*, 2006). Muitos dos compostos produzidos estão sendo pesquisados para desenvolvimento de produtos comerciais, como a abamectina, um membro do grupo de avermectina obtido a partir dos produtos de fermentação de *Streptomyces avermitilis*, que pode ser utilizado no tratamento de sementes e do solo para controle de nematóides (El-NAGDI e YOUSSEF, 2004) e é registrado no Brasil para controle de *Ditylenchus dipsaci* em alho (AGROFIT, 2013) e a ferverulina para controle de *M. incognita* (RUANPANUN *et al.*, 2011)

Além disso, *Streptomyces* produzem inúmeras substâncias que também atuam contra outros patógenos como fungos (CHUNG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2004; PRABAVATHY *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008) e bactérias fitopatogênicas (El-Shanshoury 1994; Liu *et al.* 1995; Ndonge e Semu 2000). E são relatados como facilitadores de simbiose (FREY *et al.*, 2007), abrindo caminho para formulações combinadas, utilizando outros micro-organismos promotores de crescimento.

Porém, segundo Tarkka *et al.* (2008), apesar dessa vantagem, alguns metabólitos produzidos por estreptomicetos podem estar envolvidos também na estimulação de organismos fitopatogênicos, esses pesquisadores estão trabalhando na identificação desses compostos e dos genes envolvidos nesses processos para selecionar biocontroladores, levando em consideração as complexas interações que podem ocorrer no solo.

Analogamente, observou-se, o efeito dos tratamentos com rizobactérias estimulando o aumento das populações de *Helicotylenchus* spp., entre estes, F71 e FB62, aplicados no tratamento de mudas, e dos actinomicetos F75 e F78 quando aplicados no tratamento do solo. *Helicotylenchus* spp. é um nematoide ectoparasita, considerado de menor importância para figueira, contudo, quando presente em elevadas populações e combinado a outros fitonematoides pode causar danos consideráveis em diversas frutíferas (SOUZA *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2009; DIAZ-SILVEIRA; HERRERA, 1998).

Outro aspecto importante é o impacto dos tratamentos bacterianos sobre populações não alvo, nesse sentido, é desejável que os biocontroladores não possuam efeito adverso sobre organismos benéficos, porém, o isolado F78 assim como os isolados F08, F76, FB39, FB59, FB60, FB62 e FB68 reduziram as populações de nematoides de vida livre. Esses organismos possuem um papel importante na dinâmica de populações e ciclagem de nutrientes no solo. Além disso,

ocupam nichos importantes como bacteriófagos e micófagos, liberando nutrientes mineralizados pelos decompositores (WHITFORD *et al.*, 1982; MIKOLA, 1998). Adicionalmente, regulam a população de decompositores, pois ao se alimentar de fungos e bactérias, mantêm os decompositores na fase de crescimento exponencial (ANDERSON *et al.*, 1891).

Contudo, observou-se que o efeito do isolado F75 sobre nematóides de vida livre diferiu entre os dois métodos de aplicação, pois quando a bactéria foi utilizada para microbiolização das mudas obteve-se um efeito positivo sobre os nematóides de vida livre, por outro lado, quando foi utilizada no tratamento do solo, o efeito sobre nematóides de vida livre foi negativo (Fig.12, Tab.10), indicando que o método de aplicação do agente de controle biológico pode contribuir para minimizar efeitos indesejáveis sobre a nematofauna do solo.

Como descrito anteriormente, de acordo com os resultados obtidos nesse estudo, o isolado F78 (*Streptomyces* sp.) foi o mais promissor em relação ao biocontrole de *M. incognita*. Entretanto, o efeito supressor desse isolado sobre o nematoide, no solo, não correspondeu às expectativas geradas pelos percentuais de inibição da eclosão e efeito nematicida verificado nos testes *in vitro*.

A disparidade entre resultados *in vitro* e *in vivo* é frequentemente relatada em trabalhos com agentes de controle biológico, contudo, diversos trabalhos envolvendo estreptomicetos demonstram que é possível otimizar a eficiência dos agentes de controle biológico estimulando a produção de compostos bioativos por meio de formulações ou condições de cultivo adequadas (GAO *et al.*, 2009).

A produção de compostos envolvidos no biocontrole por actinomicetos é regulada por vários fatores físico-químicos como disponibilidade de nutrientes, teor de oxigênio e temperatura (CUNDLIFFE, 2006). Dessa forma é importante avaliar a influência das condições de cultivo sobre a produção de metabólitos tóxicos aos nematóides e estudar a utilização de formulações que possam proporcionar maior eficiência de biocontrole.

Nesse sentido, a investigação do perfil metabólico das bactérias e das condições que interferem no biocontrole e produção de compostos bioativos, são importantes para propor alternativas que possam viabilizar a utilização destes agentes.

Muitas pesquisas têm avaliado também a utilização de consórcios microbianos e combinações de isolados como estratégia para melhorar a eficiência

do controle biológico. Em trabalho de Corrêa *et al.* (2012) avaliando o efeito de combinações de três isolados bacterianos sobre reprodução de *M. incognita* e a produção de feijão, os autores constataram a importância dessas combinações piramidando diferentes mecanismos de atuação para proporcionar maiores níveis de controle biológico da *M. incognita* e crescimento vegetal.

Outras pesquisas apontam também, o potencial de resíduos agrícolas como condicionadores do solo e inibidores de *M. incognita* em figueiras (FORMENTINI, 2009; SANTOS, 2010). A incorporação de resíduos orgânicos como manejo do solo é importante, pois melhora a estrutura e a fertilidade do solo, além de apresentar potencial para o controle de fitonematóides (AKHTAR; MALIK, 2000), pois a decomposição da matéria orgânica incorporada ao solo favorece a proliferação de inimigos naturais dos nematóides, tais quais os fungos, bactérias, e nematóides predadores (CULBREATH *et al.*, 1986; HALLMANN *et al.*, 1999).

Assim a combinação de isolados e a compatibilidade dos isolados com outras técnicas de manejo, como a incorporação de matéria orgânica, deve ser avaliada em ensaios futuros com os agentes de controle biológico selecionados nesse trabalho. Além disso, é importante também avaliar a utilização combinada de bactérias e porta enxertos de figueira tolerantes ou resistentes ao nematoide das galhas, visto que o uso de agentes para o controle biológico dos fitonematoides é apenas uma das etapas do manejo integrado das doenças, e, o controle de *M. incognita* é ponto chave para a cultura da figueira.

3.4 Conclusões

- a) O parasitismo de *M. incognita* em *F. carica* cv. Roxo de Valinhos interfere negativamente em funções vitais da planta associadas ao seu desenvolvimento;
- b) Existem isolados bacterianos capazes de controlar *Meloidogyne incognita* em figueira tanto quando aplicados no tratamento de mudas (microbiolização) como quando aplicados no tratamento do solo (biofumigação);
- c) A técnica empregada para administração do biocontrolador interfere na sua eficiência;
- d) Isolados selecionados para controle de *M. incognita* interferem na nematofauna do solo podendo estimular ou inibir outros nematoides habitantes do solo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível observar que existem rizobactérias com potencial para controle biológico de *M. incognita* em figueira; no entanto, para as condições na qual esse estudo foi desenvolvido, há pequena relação entre efeito biocontrolador dos antagonistas e parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plantas.

Considerando que a utilização de inóculo de *Meloidogyne* sp. muito alto pode subestimar os resultados do controle, em relação aos parâmetros de desenvolvimento das plantas (ABRAO; MAZZAFERA, 2001), novos trabalhos são necessários para avaliar a eficiência dos biocontroladores sob diferentes níveis populacionais de *M. incognita* na cultura da figueira.

É importante avaliar o efeito dos tratamentos em longo prazo, em plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, visto que a figueira é uma planta perene e neste trabalho foram avaliadas somente mudas jovens.

Além disso, a hipótese de que as bactérias testadas podem apresentar efeitos negativos a figueira deve ser avaliada, visto que alguns gêneros de bactérias utilizados nesse trabalho são relatados como deletérios.

Apesar das dificuldades encontradas na pesquisa de agentes de controle biológico, como a necessidade de estudos para compreensão dos mecanismos envolvidos no biocontrole e avaliação dos impactos ambientais envolvidos na utilização dos agentes biológicos é importante salientar que esse mercado tem crescido no Brasil e apresenta perspectivas de expansão (BETTIOL, 2011).

Outro fator a ser considerado, na perspectiva do manejo integrado de pragas, é que o controle de fitonematoides envolve diferentes medidas, assim, a utilização de biocontroladores não deve ser uma alternativa isolada, mas deve ser estudada na

perspectiva de integração a outros métodos como a incorporação de matéria orgânica no solo e a utilização de porta-enxertos resistentes e ou tolerantes.

Além disso, para o patossistema avaliado nesse trabalho, não existem alternativas de manejo economicamente viáveis no Brasil, assim, as reduções observadas no fator de reprodução de *M. incognita*, apesar de alcançarem no máximo 49%, podem, em conjunto com outras técnicas de manejo, representar uma alternativa viável ao produtor.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, I. M.; VIEIRA DOS SANTOS, M. C.; DA CONCEIÇÃO, L. P. M.; SANTOS, M. S. N. de A.; VOVLAS, N. Root-knot and Other Plant-parasitic Nematodes Associated With Fig Trees in Portugal. **Nematol. mediterr.**, v.36, p.131-136, 2008.

ABRAO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia** [online]. 2001, v.60, n.1, p.19-26. ISSN 1678-4499.

AGROFIT: **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2003** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: jul. 2013.

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v.74, p.35-47, 2000.

ALICE WEB. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/menu/index/item/aliceweb>>. Acesso em: 10 maio 2013.

ALISSON, L. Organic carbon: In: BLACK, C. A. et al. (eds.). **Methods of soils analysis; chemical and microbiological properties**. Madison, ASA, 1965. p.1367-1378.

ALVARENGA, I. R.; FORTES, J. M. Cultivares de fruteiras de clima temperado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.124, p.3-24, 1995.

ALVES, G. C. S.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; JESUS, F. G.; ALMEIDA, E. J.; THULER, R. T. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zeae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.4, p.557-564, out./dez., 2011.

ANDERSON, R. R.; COLEMAN, D. C.; COLE, C. V.; ELLIOT, E.T. Effect of the nematodes *Acrobeloides lheritieri* on substrate utilization and nitrogen and phosphorus mineralization in soli. **Ecology**, v.62, n.3, p.549-555, 1981.

ARDUIM, G. S.. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita* raça 2 e promoção de crescimento de figueira por rizobactérias**. 2006. 50 f. Mestrado em Fitossanidade. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v.24, n.1, p.1-15, 1949.

ASHOUB, A. H.; AMARA, M. T. Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera Against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of American Science**, v.6, n.10, 2010.

ASMUS, G.; FERRAZ, L. C. C. B. Relações entre a densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, fotossíntese e os danos causados a variedades de soja. **Nematologia brasileira**, v.25, n.1, p.1-13, 2001.

BARRA, V. R.; SILVA, R. da; FERRAZ, H. G. M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MENDONÇA, H. L., VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de Plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BECKER, J.O.; ZAVALA-MEJIA, E.; COLBERT, S.F.; SCHROTH, M.N.; WEINHOLD, A.R.; HANCOCK, J.G.; GUNDY, S.D.V.; VAN-GUNDY, S.D. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. **Phytopathology**, v.78, p.1466-1469, 1988.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**. v. 22, p. 280-284, 2011.

BIRD, A. F. Plant response to root-knot nematode. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.69-85, 1974.

BIRD, A. F.; McCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. **Parasitology**, v.72, p.19-28, 1976.

BIRD, D. M. K.; KOLTAL, H. Plant parasitic nematodes: habitats, hormones and horizontally-acquired genes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.183-94, 2000.

BUENO, P. R. R.; GONÇALVES, F. A. P.; ASCÊNCIO, F. Avaliação da distribuição espacial e de níveis de infestação de nematoides na área de figueira (*Ficus carica* .) Do campo experimental “Coração da terra” FAEF Garça – SP. **Revista científica eletrônica de agronomia**, a.V, n.10, dez. 2006.

CAMPOS, A. D; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenoloxidase em plantas**. EMBRAPA: Comunicado Técnico 87, 2003, 3p.

CAMPOS, V. P. Nematoides na cultura da figueira. **Informe Agropecuário**, v.18, n.188, p.33-38, 1997.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. Controle de fitonematoides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.283-314, 1998.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARNEIRO, R. G.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, L. C. C. B. Carbon Partitioning in Soybean Infected with *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* . **Journal of nematology**, v.31, n.3, p.348-355, 1999.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p.35-44, 2001.

CARNEIRO, R. M. D. G.; SOUZA, I. S; BELARMINO, L. C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica* . **Nematologia Brasileira**, v.22, p.12-21, 1998.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa soja, 1999. 36p.

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

CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Effects of soil treatments on the survival of soil microorganisms. **Journal of Nematology**, v.27, n.4, p.661-663, 1995.

CHRISTIE, J. R.; PERRY, V. G. Removing nematodes from the soil. **Proceedings of the Washington Helminthological Society**, v.18, p.106-108, 1951.

CHUNG, W. C.; HUANG, J. W.; HUANG, H. C. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. **Biol Control**, v.32, p.287-294, 2005.

COHN, E.; DUNCAN, L. W. Nematode parasites of subtropical and tropical fruit trees.. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. Wallingford, UK: CAB International, 1990. p.347-362.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogine javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.3, p.232-238, 2005.

CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant Microbe Interact**, v.21, p.208-18, 2008.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M.; MAUCH, M. B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends Plant Sci**, v.7, p.210-6, 2002.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B.; SOMAVILLA, L.; ROCHA, D. J. A.; ANTUNES, D. I. Potential of seed microbiolization with rhizobacteria to control of root-knot nematode in common bean. **Nematropica**, v.42, p.343-350, 2012.

CRONIN, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DUNNE, C.; O'GARA, F. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.433-440, 1997,

CULBREATH, A.K. RODRIGUEZ-KANA, R., MORGAN-JONES, G. Chitin and *Paecilomyces lilacinus* for control of *Meloidogyne arenaria*. **Nematropica**, v.16, p.153-166, 1986.

CUNDLIFFE, E. Antibiotic production of actinomycetes: the janus face of regulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p. 500-5006, 2006.

DACKMAN, C.; CHET, I.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.62, p.201-208, 1989.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2 ed. Flórida: CRC P Life Sciences and Medicine Research, v.2011: LSMR-21 ress, 1995. 434p.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Fitonematoides associados a frutíferas na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. v.32, n.4, p.1064-1071, 2010.

DIAZ-SILVEIRA, M. F.; HERRERA, J. O. An overview of nematological problems in Cuba. **Nematrópica Auburn**, v.28, n.2, p.151-164, 1998.

DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B. M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant- parasitic nematodes. **J Chem Ecol**, v.19, n.159-173, 1993.

DOOLOTKELDIEVA, T. D.; TOTUBAEVA, N. E. New Strains of *Streptomyces* as Producers of Biofungicides and Biological Stimulators for Protection of the Shoots and Seedlings of Tiang-Shang Spruce Fir (*Picea Schrenkiana*). **Microbiology Insights**, Issue.2, p.1, 2009.

DORHOUT, R.; GOMMERS, F. J.; KOLLOFFEL, C. Ploem transport of carboxifluorescein trough tomato roots infect with *Meloidogyne incognita*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p.1-10, 1993.

DUNNE, C.; DELANY, I.; FENTON, A.; O'GARA, F. Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. **Agronomie**, v.16, p.721±729, FAO, 2013.

EL-BORAI, F.; DUNCAN, L. W. Nematose parasites of subtropical and tropical fruit tree crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIEDGE, J. **Plant parasites nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2. ed. CAB International, 2005, 871p.

EL-NAGDI, W. M. A.; YOUSSEF, M. M. A. Soaking faba bean seed in some bio-agents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* root-knot nematode infection. 2004. **J Pest Sci**, v.77, p.75-78, El-Shanshoury, 1994.

EL-SHANSHOURY, A. R. *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces atroolivaceus* as biocontrol agents of *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. **Acta Microbiol Pol**, v.43, p.79-87, 1994.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1999, 412p.

FABRY, C. F. S.; FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; COUTINHO, M. M.; TÓTOLA, M. R.; OLIVEIRA, J. R.; GIARETTA, R. D.; FERRAZ, S. Obtenção de Bactérias para a o Biocontrole de *Meloidogyne javanica* por Meio de Aquecimento de Solo e Tratamento com Filtrado de Raízes de Plantas Antagonistas a Fitonematoides. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.1, jan./fev, 2007.

FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. **Plant Bacterial Diseases**. Academic Press Australia, 1983. p.393.

FAO - Food and agriculture organization of the united nations. **Figs Production. Statistical Databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

FERRAZ, L. C. B.; ROSSI, C. E. Patogenicidade de *Meloidogyne incognita* raça 2 e *M. javanica* (Nemata: Tylenchoidea) a cultivares de canola. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.74, p.317-324, 1999.

FERRAZ, L. C. C. B.; PEREIRA, F. M.; BOLONHEZI, A. C. Danos causados por nematoides de galhas em mudas de figueira cv. Roxo-de-Valinhos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.2, n.2, p.47-53, 1980.

FERRAZ, L. C. C. B.; PEREIRA, F. M.; VALENTE, J. Considerações sobre o use de nematicidas em viveiro visando a recuperação de mudas de *Ficus carica* ev. roxo de valinhos infestadas por *Meloidogyne incognita*. In: LORDELLO, L.G.E. (ed.) **Trabalhos apresentados a VI Reunião Brasileira de Nematologia**, 8-12 fev. 1982, Fortaleza. n.6. Sociedade Brasileira de Nematologia, Piracicaba, SP, Brazil, p.13-20.

FERRAZ, S. Summary report on the current status, progress and needs for *Meloidogyne* research in Brazil (Region III). In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Biology and control. Raleigh: North Caroline State University Graphics, 1985. p. 351-352. v.I.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627-650, 1927.

FORMENTINI, H. M. **Manipueira no controle de Meloidogyne incongita e no rendimento da figueira (Ficus carica L.) cv. Roxo de Valinhos no oeste paranaense**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) UNIOESTE/AGRONOMIA, 2009.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK JR, P. How Close Is Close: 16s rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. **International Journal of systematic Bacteriology**, v42, n.1, p.166-170, 1992.

FRANK, J. A.; REICH, C. I.; SHARMA, S.; WEISBAUM, J. S.; WILSON, B. A.; OLSEN, G. J. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. **Appl Environ Microb**, v.74, p.2461–2470, 2008.

FREITAS, L. G. de; CARNEIRO, R. M. D. G. Controle biológico de fitonematoides por *Pasteuria* spp. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 388p.

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 nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.2, p.215-220, 2005.

FREY, K. P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytol**, v.176, p.176:22-36, 2007.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Adv Microb Physiol**, v.41, p.47-92, 1999.

GAO, H.; LIU, M.; LIU, J.; DAIA, H.; ZHOU, X.; LIU, X.; ZHUO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.4012-4016, 2009.

GARDIANO, C. G.; SILAMAR, F.; LOPES, E. A.; FERREIRA, P. A.; AMORA, D. X.; DE FREITAS, L. G. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, 2009.

GIACOBBO, C. L.; PICCOLOTTO, L.; KRÜGER, L. R.; PARISOTTO, E.; TIBOLA, C.; FACHINELLO, J. C. Cultivo da figueira conduzida em quatro diferentes densidades de plantio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.43-46, jan./mar., 2007.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v.61, p.793-796, 1995.

GOMES, C. B.; FREITAS, L. G. de; FERRAZ, S.; OLIVEIRA, R. D. de L.; OSÓRIO, V. E. Efeito do número de endósporos de *Pasteuria penetrans* e do método de promoção da adesão sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* e produção da bactéria em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.26, n.2, p.119-130, 2002.

GOMES, C. B.; SOMAVILLA, L.; CARNEIRO, R. M. D. G. ; ZECCA, A. G. D.; COSTA, F. A.; LIMA-MEDINA, I. **Monitoramento do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em figueira (*Ficus carica*) no Rio grande do Sul. Pelotas-RS: Embrapa Clima Temperado, 2009, 18p. (Boletim Pesquisas e Desenvolvimento (n.86).**

GORBUSHINA, A. A. Life on the rocks-minireview. **Environ Microbiol**, v.9, n.7, p.1613-1631, 2007.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

HALLMAN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.155-162. 1996.

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p.551-560, 1999.

HIRSCH, P.; MEVS, U.; KROPPESTEDT, R.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT E. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. **Syst Appl Microbiol**, v.27, p.166-174. 2004.

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

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Sistema de Recuperação automática SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11&i=P> 2013>. Acesso em: 19 abr. 2013.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Repórter**, v.48, p.692, 1964.

JJEMBA, P. K.; ALEXANDER, M. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, n.4, p.623-632, 1999.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.

KANAGY, J. M. N.; KAYA, H. K. The possible role of marigold roots and α -terthienyl in mediating host-finding by steinernematid nematodes. **Nematologica**, v.42, p.220-231, 1996.

KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. **Phytopathology**, v.38, p.423-441, 2000.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v.31, p.346-52, 2004.

KLOEPPER, J. W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., MCINROY, J. A.; YOUNG R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and rootknot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v.139, p.74-84, 1992.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: International Conference on Plant Pathogenic Bacterial. **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacterial**, Angers: INRA, p.879-882, 1978.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. **Plant growth promoting rhizobacteria on radishes**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIAL, 4., 1978, Angus.

KNIGHT Jr, R. J. Origin and world importance of tropical and sub-tropical fruit crops. In: NAGY, S.; SHAW, P. E. (Eds.). Tropical and Sub-tropical Fruits. Composition, Properties and Uses. **AVI Publishing**, Inc., Westport, Connecticut, p.1-120, 1980.

KOENNING, S.R.; OVERSTREET, C.; NOLING, J.W.; DONALD, P.A.; BECKER, J.O.; FORTNUM, B.A. 1999. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, 31: 587-618.

KREMER, R. J.; KENNEDY, A. C. Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. **Weed Technology**, Champaign, v. 10, p. 601-609, 1996.

KRISHNA M. G., PALLAVI, E.; RAVI, K. B.; RAMESH, M.; VENKATESH, S. Hepatoprotective activity of *Ficus carica* Linn. leaf extract against carbon

tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, n.3, p.162 -166, 2007.

KRNJAIC, D.; KRNJAIC, S.; BACIC, J. Distribution and population density of fig cyst nematode (*Heterodera fici* Kirjanova) in the region of SR Yugoslavia. **Zastita Bilja**, v.48, p.245–251, 1997.

L-BORAI, F. E.; DUNCAN, L. W. Nematodes parasites of subtropical and tropical fruit tree crops. In: . LUC, M.; SOKORA, R. A.; BRIFGE, J. **Plant parasitic nematodes in sub-tropical and tropical agriculture**. 2. ed. P and tropical agriculture. aris: CAB Publishing, 2005.

LEHR, N. A.; SCHREY, S. D.; HAMPP, R.; TARKKA, M. T. Root inoculation with a forest soil streptomyces leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. **New Phytol**, v.177, p.965-76, 2008.

LEONEL, S.; FIGUEIRA, A. **Revista brasileira de fruticultura**, v.30, n.3, p.577-856. 2008.

LI, G.; ZHANG, K.; XU, J.; DONG, J.; LIU, Y. Nematicidal substances from fungi. **Recente patents on Biotechnology**, v.1, n.3, p.212-233, 2007.

LI, H. M.; XU, J. H.; SHEN, P. Y.; CHENG, H. R.; LI, H. M.; XU, J. H.; SHEN, P. Y.; CHENG, H. R. Distribution and seasonal dynamic changes of nematode parasites in fig main growing areas in Jiangsu Province. **Journal of Nanjing Agricultural University**, v.22, p.38-41, 1999.

LIMA MEDINA, I.; GOMES, C.B.; ROSSI, C.E.; CARNEIRO, R.M.G. caracterização e identificação de populações de nematoides de galhas provenientes de figueiras (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v.30, n.2, p.179-187, 2006.

LIMA-MEDINA, I. L.; GOMES, C. B.; ROSSI, C. E.; CARNEIRO, R. M. G. Caracterização e identificação de populações de nematoides de galhas provenientes de figueiras (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v.30, n.2, p.179-187, 2006.

LIMA-MEDINA, I.; SOMAVILLA, L.; CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Espécies de *Meloidogyne* em figueira (*Ficus carica*) e em plantas infestantes. **Nematropica**, v.43, n.1, 2013.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance against cucumber bacterial angular leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* p.v.

lachrymans with two plant growth-promoting rhizobacterial strains. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995a.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.695-698, 1995b.

LIU, Q.; WU, Y. H.; YU, J. C. Purification of active components SN06 in fermentation of *Streptomyces rimosus* MY02. **Acta Phytopath Sinica**, v.31, p.353-358, 2004.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; ROBERTSON, W. M. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. **Experimental Mycology**, v.16, p.61-7, 1992.

LOVEYS, B. R.; BIRD, A. The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, v.3, p.525-529, 1973.

MACAGNANI, D.; ROMEIRO, R. S.; PEREIRA, M. C. B.; LANNA-FILHO, R.; BATISTAI, D. S.; POMELLA, W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa phytopathol**, v.34 n.1 Botucatu, jan./feb., 2008

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E. da.; FIÚZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**, v.16, n.2, p.165-182, jun., 2012

MAI, W. F.; MULLIN, P. G. **Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera**. 5. ed. Nova York: Cornell University Press Ithaca, 1996. 277p.

MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; DI MAURO, A. O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.732-736, 2001.

MAIORANO, J. A.; ANTUNES, L. E. C.; REGINA, M. de A. *et al.* Botânica e caracterização de cultivares da figueira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.22-24, 1997.

MANKAU, R. Biological control of nematode pests by natural enemies. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.415-40, 1980.

MAO, D. P.; ZHOU, Q.; CHEN, C. Y.; QUAN, Z. X. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. **BioMed Central, Microbiology**, v.12, n.66, p.1-8, 2012.

MARIANO, R.; SILVEIRA, E. B. da. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRP, 2005, 184p.

McSORLEY, R. Nematological problems in tropical and subtropical fruit tree crops. **Nematropica**, v.22, p.103-116, 1992.

McSORLEY, R. Plant Parasitic Nematodes Associated with Tropical and Sub-tropical Fruits. **Agricultural Experiment Station Institute of Food and Agricultural Science**, University of Florida, Gainesville, Florida, Bulletin 823, 1981.

MEDEIROS, A. R. M. **Figueira (*Ficus carica* L.) do plantio ao processamento**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, dez. 2002. 16p. (Embrapa-CPACT. Circular Técnica, n.35).

MELABERHAN, H.; BROOKE, R. C.; WEBSTER, J. M. Relationship between physiological response of French beans of different age to *Meloidogyne incognita* and subsequent yield loss. **Plant Pathology**, v.35, p.203-213, 1986.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. 264p.

MERCER, C. F.; GREENWOOD, D. R.; GRANT, J. L. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* chitwood (Nematoda: Tylenchida). **Nematologica**, v.38, p.227-236, 1992.

MEYER, S. L. F. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service research programs on microbes for management of plant-parasitic nematodes. **Pest Management Science**, v.59, p.665-670, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.708>>.

MIKOLA, J.; HEIKKI S. No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. **Ecology**, v.79, p.153-164, 1998.

MISHRA, S. K.; KELLER, J. E.; MILLER, J. R.; HEISEY, R. M.; NAIR, M. G.; PUTNAM, A. R. Insecticidal and nematicidal properties of microbial metabolites. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.2, p.267-276, 1987.

NAGESH, M.; DHAWAN, S. C. Effect of inoculum density of *Heterodera avenae* on photosynthetic efficiency, chlorophyll, and mineral contents of wheat. **Indian Journal of Nematology**, v.18, p.40-43, 1988.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.655-670, 2003.

NAUTIYAL, C. S. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.70, p.265-270, 1999.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.384-388, 2004.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de fungos predadores de nematoide no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, v.15, p.72-76, 1991.

NDONDE, M. J. M.; SEMU, E. Preliminary characterisation of some *Streptomyces* species from four Tanzanian soils and their antimicrobial potential against selected plant and animal pathogenic bacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.16, p.595-599, 2000.

NEAL, J. C. The root-knot disease of the peach, orange and other plants in Florida due to the work of *Anguillula*. **Bulletin of the United States Bureau of Entomology**, v.20, p.1-31, 1889.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.95-99, 1995.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biological Science and Technology**, v.3, p.115-126, 1993.

OLIVEIRA, A. P.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; SILVA, B. M.; TAVARES, F.; ANDRADE, P. B. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2841-2846, 2009.

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal approach. **Annual Rev. Microbial**, v.40, p.337-365, 1986.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, Nederland, v.66, n.4, p.1-46, 1966.

PARK, J. O.; HARGREAVES, J. R.; MCCONVILLE, E. J.; STIRLING, G. R.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.271-276, 2004.

PATIL, V. V.; BHANGALE, S. C., PATIL, V. R.. Studies on immunomodulatory activity of *Ficus carica* . **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.4, p.9799, 2010.

PENTEADO, S. R. O cultivo da figueira no Brasil e no Mundo. In: CORRÊA, L. S. de; BOLIANI, A. C. (Eds.). **Cultura da figueira - do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p.1-16.

PRABAVATHY, V. R.; MATHIVANAN, N.; SAGADEVAN, E.; MURUGESAN, K.; LALITHAKUMARI, D. **Intra-strain protoplast fusion enhances carboxymethyl cellulase activity in *Trichoderma reesei***. Enzyme, 2006.

PRAKOB, W.; HOM, J. N.; SILAPAPONGPRI, P. J. S.; THANUNCHAI, J.; CHAISUK, P. Biological control of lettuce root-knot disease by the used of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. **Journal of Agricultural Technology**, v.5, n.1, p.179-191, 2009.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant Soil**, v.244, p.9-17, 2002.

RANDHAWA, N.; SAKHUJA, P. K.; SINGH, I. Management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato with organic amendments. **The Plant Disease Research**, v.16, p.274-276, 2001.

RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, F. R. P.; XAVIER, A. A.; ALMEIDA, V. F.; MIZOBUTSI, E. H.; CAMPOS, V. P.; FERRAZ, S.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Flutuação populacional e efeito da distância e profundidade sobre nematoide em bananeira no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.31, n.1, p.103-111, 2009.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, **Collingwood**, v.28, p.897-906, 2001.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; CHET, I. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. **Plant and Soil**, v.100, p.237-247, 1987.

ROMEIRO, R. S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa Ed UFV, 2007, 269p.

ROSSI, C. E. Nematoides em fruteiras. VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas. Indaiatuba, SP, 2002. **Anais da VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas**. Coordenada por José Eduardo M. de Almeida e Miguel Francisco de Souza Filho. p.5-22.

ROSSI, C. E. Nematoides em fruteiras. VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas. Indaiatuba, SP, 2002. **Anais da VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Frutas**. Coordenada por José Eduardo M. de Almeida e Miguel Francisco de Souza Filho. p.5-22.

RUANPANUN, P.; LAATSCH, H.; TANGCHITSOMKID, N.; LUMYONG, S. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.27, n.6, p.1373-1380, June, 2011.

RYU, E. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v.17, p.58-63, 1940.

SACCHI, C. T.; WHITNEY, A. M.; MAYER, L. W.; MOREY, R.; STEIGERWALT, A.; BORAS, A.; WEYANT, R. S.; POPOVIC, T. Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.10, Oct. 2002.

SAKHUJA, P. K.; JAIN, R. K. Nematode diseases of vegetable crops and their management. In: THIND, T.S. (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables and their Management**. Ludhiana: Kalyani Pub., 2001. p.10-29.

SAMAC, D. A.; KINDEL, L. L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant Soil**, v.235, p.35-44, 2001.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 92p. Tese de Doutorado. Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

SANTOS, A. V. dos; GOMES, C. B.; MOURA, A. B.; ARDUIM, G. S. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita* em figueira pelo uso de rizobactérias**. In: Anais do 1o IDÉIAS, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 1.. Pelotas-RS: Embrapa Clima Temperado, 2006. p.19.

SANTOS, A. V. **Potencial de uso da cultura da mamona e de seus subprodutos no manejo de áreas infestadas pelo nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) e seus efeitos sobre outros nematoides**. 2010. 58f. – Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

SARATHCHANDRA, S. U.; WATSON, R. N.; COX, N. R.; MENNA, M. E.; BROWN, J. A.; BURCH, G.; NEVILLE, F. J. Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.22, p.221-223, 1996.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373p.

SCHANS, J.; ARNTZEN, F. K. Photosynthesis, transpiration and plant growth characters of different potato cultivars at various densities of *Globodera pallida*. Netherland **Journal of Plant Pathology**, v.97, p.297-310, 1991.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **J Bacteriol**, v.173, p.4371-4378, 1991.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, v.216, p.1376-1381, 1982.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal Biochem**, v.160, p.47-56, 1987.

SCOTTO, L. A.; MASSÈSE, C.; DEPORTES, L.; MERCIER, S.; ROGER, J. Les principaux ennemis du figuier: les nematodes et maladies. **Phytoma – Défense des Cultures**, v.354, p.39-41, 1984.

SHARKEY, F. H.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. **Appl Environ Microb**, v.70, p.3795-3806, 2004.

SIDDIQUI, I. A.; EHETSHAMUL-HAQUE, S.; SHAUKAT, S. S. Use of Rhizobacteria in the Control of Root Rot-Root Knot Disease Complex of Mungbean. **J. Phytopathology**, v.149, p.337-346, 2001.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Trichoderma harzianum enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.169-175, 2004.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Liquid culture carbon, nitrogen and inorganic phosphate source regulate nematicidal activity by fluorescent pseudomonads *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, Pakistan, v.38, p.185-190, 2004.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of rhizobacteria in the management of plant-parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v.69, p.167-179, 1999.

SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medicine Facuteit Landbouwwettenschapelipke Rijksuniversiteit Gent**, v.53, n.2b, p.867-878, 1988.

SILVEIRA, A. P.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas, SP: Instituto Agronômico, 2007. 312p.

SILVEIRA, A.; GRAMINHA, E. B. N.; NUNES, T. L. S.; VERONEZ, V. A; SANTOS, J. M.; DE OLIVEIRA, J. C. **Microscopia eletrônica de varredura da habilidade predatória de agentes do biocontrole de nematoides**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.22, n.1, p.113-120, jan./jun. 2001

SLAVIN, J. Figs: Past, Present, and Future. **Nutrition Today**, v.41, n.4, july/august, 2006.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. **Critical Review Microbiology**, v.30, p.205-240, 2004.

SOUSA, C. da S.; COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; PEREZ, J. O. Atividade nematicida de exsudatos de *Streptomyces* sp. Sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.207-209, 2005.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.12, p.1759-1766, dez. 2006.

SOUZA, J. T.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P. Nematoides associados a plantas frutíferas em alguns estados brasileiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.353-357, 1999.

STADLER, M.; DAGNE, E.; ANKE, H. Nematicidal activities of two phytoalexins from *Taverniera abyssinica*. **Planta Med.** v.60, p.550-52, 1994.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v.10, n.1, p.18-46, 2011.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annu Rev Microbiol**, v.45, p.137-161, 1991.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant-parasitic nematodes**. Wallingford, UK, CAB International, 1991, 282p.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. **Journal of Nematology**, v;11, p.282-288, 1979.

SUN, M. H.; GAO, L.; SHI, Y. X.; LI, B. J.; LIU, X. Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **J Invertebr Pathol**, v.93, p.22-28, 2006.

SUSLOW, T. V. Role of root colonizing bacteria in plant growth.. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. S. (Eds.). **Phytopathogenic Prokaryotes**. New York, NY: Academic Press, 1982. p.187-223.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Role of deleterious rhizobacteria as minor plant pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p. 111-115, 1982.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.**, v.10, p.63-68, 1959.

TARKKA, M. T.; HAMPP, R. Secondary metabolites of soil streptomycetes in biotic interactions. In: KARLOVSKY P. (Ed.). **Secondary Metabolites in Soil Ecology**. Berlin, Germany: Springer, Soil Biology Series 2008. v.14, p.107-28.

TARKKA, M. T.; LEHR, N. A.; HAMPP, R.; SCHREY, S. D. Plant behavior upon contact with Streptomycetes. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, n.11, p. 917-919, nov. 2008.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995, 174p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5)

TIAN, B. Y.; YANG, J. K.; LIAN, L. H.; WANG, C. Y.; ZHANG, K. Q. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.372-380, 2007.

TIKHONOV, V. E.; LÓPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; JANSSON, H-B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v.35, p.67-78, 2002.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v.107, n.1, p.85-93, 2001.

UNL NEMATOLOGY LAB. **Interactive Diagnostic Key to Plant Parasitic, Freelifing and Predaceous Nematodes**. Disponível em: <<http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>>. Acesso em: jan. 2012. ON

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VOUYOUKALOU, E.; STEFANOUDAKI, E. Nematicidal activity of waste water from olive oil mills. **Nematol. Medit.** v.26, p.157-160, 1998.

WALLACE, H. R. The influence of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on photosynthesis and on nutrient demand by roots of tomato plants. **Nematologica**, v.20, p.27-33, 1974.

WEI, B. Q.; XUE, Q. Y.; WEI, L. H.; NIU, D. D.; LIU, H. X.; CHEN, L. F.; GUO, J. H. A novel screening strategy to identify biocontrol fungi using protease production or chitinase activity against *Meloidogyne* root-knot nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v.19, n.8, p.859–870, 2009.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v.40, p.309-348, 2002.

WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D. Inhibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, v.83, p.1245-1249, 1993.

WHARTON, D. Nematode egg-shells. **Parasitology**, v.81, p.447-463, 1980.

WHITFORD, W. G.; FRECKMAN, D. W.; SANTOS, P. F.; ELKINS, N. Z.; PARKER, L. W. The role of nematode in decomposition in desert ecosystems. In: FRECKMAN, D. W. (Ed.). **Nematodes in soil ecosystems**. Austin: University of Texas Press, p.98-116, 1982.

YOON, G. Y.; LEE, Y. S.; LEE, S. Y.; PARK, R. D.; HYUN, H. N.; NAM, Y.; KIM, K. Y. Effects on *Meloidogyne incognita* of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from *Streptomyces cacaoi* GY525. **Nematology**, v.14, n.2, p.175-184, 2012.

YU, J.; LIU, Q.; LIU, Q.; LIU, X.; SUN, Q.; YAN, J.; QI, X.; FAN, S. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Bioresour Technol**, v.99, p.2087-2091, 2008.

ZHANG, Z.; Yuen, G. Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, n.384-389, 2000.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v.90, n.384-389, 2000.

ZUCKERMAN, B. M.; JASSON, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review Phytopathology**, v.22, p.95-113, 1984