

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COMO POTENCIAIS
BIOCONTROLADORAS DO NEMATOIDE ANELADO DO
PESSEGUEIRO (*Mesocriconema xenoplax*)**

Monalize Salete Mota

Pelotas, 2012

MONALIZE SALETE MOTA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COMO POTENCIAIS BIOCONTROLADORAS DO
NEMATOIDE ANELADO DO PESSEGUEIRO (*Mesocriconema xenoplax*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área do conhecimento: Fitopatologia).

Orientadora: Dra Andrea Bittencourt Moura

Co Orientador: César Bauer Gomes

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M917s Mota, Monalize Salete

Seleção de bactérias como potenciais biocontroladoras do nematoide anelado do pessegueiro (*Mesocriconema xenoplax*) / Monalize Salete Mota; orientador Andrea Bittencourt Moura; co-orientador César Bauer Gomes - Pelotas, 2012.-89f.; il..- Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Pêssego 2.Controle biológico 3.Morte precoce do pessegueiro 4.Rizobactérias 5.Atividade nematicida 6.Microbiolização de raiz I.Moura, Andrea Bittencourt (orientador) II Título.

CDD 634.25

Banca examinadora

.....
Prof. Dra. Andréa Bittencourt Moura – Orientadora - FAEM/UFPeI

.....
Prof. Dr. José Carlos Germani – UFRGs

.....
Prof. Dra. Rosângela D’Arc Lima Oliveira – UFV

.....
Prof. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias - FAEM/UFPeI

.....
Prof. Dr. Leandro José Dallagnol - FAEM/UFPeI

“Cada coisa, cada ser, cada alma,
permanece no processo evolutivo que lhe é próprio”
Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais
Manoel (*in memoriam*) e Fiorença,

DEDICO!

...

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, através da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, área de concentração Fitopatologia, pela oportunidade e espaço concedido.

À Embrapa Clima Temperado, pelo apoio concedido, disponibilidade de laboratórios, equipamentos e local para o experimento.

À professora Andréa Bittencourt Moura, pela orientação, auxílio, incentivo e compartilhar seus conhecimentos durante todo o período de realização dos trabalhos de pesquisa e elaboração desta tese.

Ao Pesquisador da Embrapa César Bauer Gomes, pela co-orientação, confiança, incentivo e auxílio durante a realização dos experimentos, bem como pela sua cumplicidade e contribuição na elaboração da tese.

A minha família pelo amor e por acreditarem sempre na minha capacidade de evolução pessoal e profissional.

Aos professores do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, José Antônio Peters, Eugênia Jacira B. Braga, Valmor João Bianchi e Dra Elizete Radmann, pela amizade, orientações e disponibilização das dependências da casa de vegetação e do laboratório de cultura de tecidos de plantas para a realização de etapas essenciais dos experimentos.

A todos os professores do Departamento de Fitossanidade da UFPel, pela oportunidade de crescimento propiciada.

Aos estagiários do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Cibeli Campesato, Aline Garske, Fábio Paulino, Lauren Anacker, Marcio Costa, Paulo Benedeti, Rafael Nunes, Stefânia Moreno, pelo companheirismo e indispensável auxílio na condução deste trabalho.

Aos funcionários e bolsistas do Laboratório Fitopatologia da Embrapa, da Fernando, Claudiomar, Gelson, Aline Tietz, Chaiane Signorini e Daniele de Brum, pelo convívio e indispensável ajuda na condução e avaliação dos experimentos.

Aos colegas e amigos Dediel Rocha, Caroline Wille, Bianca Corrêa, Jaqueline Schafer, Josiane Casarin, Lúcia Somavilla, Ismail Souza Junior, Israel Medina, Rafael Negretti, Renata Mocelin, Victor Hugo Coila e Mariane Rosenthal, pelo incentivo, carinho e amizade.

À(os)s amigas(os), Ângela da Costa, Alexandra Alves Cantos, Letícia Carvalho Benitez, Luciano Moura, Rosângela Chaves e Simone Pohl pela amizade, carinho, conselhos, apoio e incentivo durante esta etapa e por todos os momentos compartilhados ao longo destes anos de amizade.

À banca examinadora pela disponibilidade, pela dedicação, análise e recomendações, indispensáveis para o aperfeiçoamento e melhorias deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul – (FAPERGs) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho e para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Muito Obrigada!!!!

Resumo

MOTA, Monalize Salete. **Seleção de bactérias como potenciais biocontroladoras do nematoide anelado do pessegueiro** (*Mesocriconema xenoplax*). 2012. 87f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Entre os problemas relatados na cultura do pessegueiro, a síndrome da morte precoce de plantas, associada à presença do nematoide anelado *Mesocriconema xenoplax*, tem se destacado no Rio Grande do Sul. Até o momento não há porta-enxerto resistente ou tolerante ao nematoide nem registro de nematicidas para uso na cultura do pessegueiro no Brasil, evidenciando a busca por práticas de manejo alternativas. Desta forma, foi objetivo deste trabalho, isolar e avaliar o potencial biocontrolador de isolados bacterianos e selecionar promissores controladores do nematoide anelado do pessegueiro. Para isto, 1.219 isolados bacterianos foram avaliados quanto à produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC) por meio da produção de lípases, proteases, quitinases, amilases, solubilização de fosfatos, produção de amônia e antibiose contra *Monilinia fructicola*. A partir destas análises foram selecionados 99 isolados bacterianos e analisada a mortalidade *in vitro* sobre *M. xenoplax*; dentre estes isolados foram selecionados 36, os quais apresentaram índices de mortalidade acima de 95% e avaliados quanto à inibição da eclosão de juvenis. Na sequência, 15 isolados foram selecionados para avaliação da colonização radicular *in vitro* de plântulas do porta-enxerto 'GxN-9' e o efeito *in vivo* sobre a população de *M. xenoplax* sob cultivo do porta-enxerto de pessegueiro 'GxN-9', como também sob o cultivo de *Dianthus barbatus*. Dentre os 1.219 isolados bacterianos, 92% foram capazes de produzir um ou mais dos oito compostos avaliados e apenas 1% dos isolados produziu todos os compostos. A atividade proteolítica foi a mais freqüente entre os isolados bacterianos e a hidrólise de quitina a menos freqüente. Na análise

de PCRBPC por habitat, 1,6% dos isolados oriundos do grupo Solo produziram 100% dos compostos analisados. Tagetes concentrou 96,1% de isolados proteolíticos em gelatina, 58,8% acumuladores de amônia, 56,9% solubilizadores de fosfato e, 54,9% amilolíticos; na sequência, o grupo das Liliáceas com 70,3% de isolados proteolíticos em Litmus[®], 63% com antibiose contra *M. fructicola*. Já em Gramíneas, 80,6% dos isolados produziram lipases. Os maiores índices de produção de quitinase foram observados em Leguminosas e Outros. Em relação a nicho ecológico, a rizosfera destacou-se, em comparação com a filosfera e solo, como melhor fonte de isolados bacterianos com potencial biocontrolador. No teste de mortalidade in vitro de *M. xenoplax*, dentre os 99 isolados bacterianos, 84 foram significativos em relação à testemunha e 33 isolados reduziram a eclosão dos ovos do nematoide em comparação com a testemunha. A colonização radicular *in vitro* foi observada por 10 dos 15 isolados testados. Na avaliação do efeito antagônico das bactérias sobre o nematoide anelado em plantas de pessegueiro, nove bactérias reduziram significativamente a reprodução do nematoide e ocorreu um aumento significativo para MFR com os isolados DFs2049 e DFs0886. No bioensaio com aplicação das bactérias em pré-plantio à *D. barbatulus*, verificou-se redução significativa da população de *M. xenoplax* em todos os tratamentos em relação à testemunha. Dessa forma, o presente trabalho demonstra que bactérias de diferentes nichos ecológicos apresentam potencial biocontrolador sobre *M. xenoplax*, nematoide associado à morte precoce do pessegueiro.

Palavras chaves: controle biológico, morte precoce do pessegueiro, rizobactérias, atividade nematicida, microbiolização de raiz.

Abstract

MOTA, Monalize Salete. **Selection of bacteria as potential biocontroller of the ring nematode of peach** (*Mesocriconema xenoplax*). 2012. 87f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

The peach tree short life syndrome (PTSL) associated to the ring nematode *Mesocriconema xenoplax* is one of the most important problems affecting peach (*Prunus persica*) orchards in the Rio Grande do Sul State. Currently there are not rootstocks resistant or tolerant to nematodes or register nematicides for the peach crops in Brazil, showing the need for alternative management practices. Purpose of this study was to isolate and evaluate the potential biocontrol of bacterial isolates and to select promising controllers of the ring nematodes on peach. For this, 1,219 bacterial isolates were evaluated for the production of compounds related to biocontrol and/or promotion of growth (PCRBPG) through the production of lipases, proteases, chitinases, amylases, phosphate solubilization, production of ammonia and antibiosis against *Monilinia fructicola*. From these analyzes were selected and analyzed 99 bacterial isolates *in vitro* of the *M. xenoplax* mortality, among these 36 isolates were selected, which showed mortality rates above 95% and evaluated for inhibition of juveniles hatching. Following, 15 isolates were selected for evaluation *in vitro* the root colonization of the rootstock 'GxN-9' seedlings and *in vivo* effect on the *M. xenoplax* population under cultivation peach rootstock 'GxN-9', as well as under cultivation *Dianthus barbatus*. Among the 1219 bacterial isolates, 92% were able to produce one or more of the eight compounds evaluated and only 1% of the isolates produced all compounds. The proteolytic activity was more frequent among bacterial isolates and hydrolysis of chitin less frequent. In the analysis of PCRBPG by habitat, 1.6% of the isolates from Soil group produced 100% of the compounds analyzed. Tagetes group concentrated 96.1% of the isolates gelatin proteolytic, 58.8% of the ammonia produced, solubilizing phosphate at 56.9% and 54.9% amylolytic; following

the Liliaceae group with 70.3% of isolates Litmus[®] proteolytic, 63% of antibiosis against *M. fructicola*. Besides that, 80,6% of Gramineae isolates group produced lipases. The highest rates of production of chitinase were observed in Leguminoseae and Other. For ecological niche, the rhizosphere stands out compared with the phyllosphere and ground, as best source of potential biocontrol bacterial strains. In the mortality assay *in vitro* of the *M. xenoplax*, among the 99 bacterial isolates, 84 were significant in relation to the control and 33 isolates reduced the nematode hatching compared with control. The *in vitro* peach root colonization was observed on 10 of the 15 isolates. Evaluation the antagonistic effect of bacteria isolates on the ring nematode on peach trees, nine bacteria reduced the nematode reproduction significantly and a significant increase for root fresh weight with isolated DFs2049 and DFs0886. The bioassay of application bacterial isolates in pre-planting to *D. barbatus*, there was significant reduction in the population of *M. xenoplax* in all treatments compared to control. Therefore, the present study that bacteria from different ecological niches show a good potential for biocontrolling *M. xenoplax*, nematode associated with PTSL.

Keywords: biological control, peach tree short life, rhizobacteria, nematicidal activity, root microbiolization.

Lista de Figuras

- Figura 1** Produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC). A) Percentual com base em oito testes; B) Percentagem total de isolados bacterianos reativos nos testes de amido, amônia, antibiose, fosfatase, gelatina, leite de Litmus®, quitina e Tween®. 29
- Figura 2** Reação dos isolados bacterianos aos meios de análise em oito testes. A) atividade amilolítica; B) produção de amônia; C) antibiose contra *Monilinia fructicola* (C1 = testemunha; C2) = intensidade de inibição do crescimento micelial (I, II e III); D) solubilização de fosfato; E) atividade proteolítica em gelatina; F) atividade proteolítica em leite de Litmus®; G) atividade quitinolítica; H) atividade lipolítica em Tween 80. 30
- Figura 3** Percentagem de bactérias produtoras de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento em função do número total de isolados por grupo habitat/hospedeiro. AMI = amido; AMO = amônia; ANT = antibiose; FOS = fosfatase; GEL = gelatina; LIT = Litmus®; QUI = quitina; TWN = Tween80. 32
- Figura 4** A) Intensidade quitinolítica dos 1219 isolados, B) Habitat dos 135 isolados quitinilíticos; C) Intensidade lipolítica dos 1219 isolados; D) Habitat dos 604 isolados produtores de lipase; E) Intensidade proteolítica em meio de gelatina dos 1219 isolados; F) Habitat dos 839 isolados produtores de proteases em gelatina; G) Intensidade proteolítica em meio leite de Litmus® dos 1219 isolados; H) Habitat dos 630 isolados produtores de proteases em leite de Litmus®. 34
- Figura 5** A) Intensidade de produção de amônia dos 1219 isolados; B) Habitat dos 531 produtores de amônia; C) intensidade amilolítica dos 1219 isolados, D) Habitat dos 443 produtores de amilase; E) intensidade antibiótica dos 1219 isolados contra *Monilinia fructicola*; F) Habitat dos 529 produtores de antibióticos; G) intensidade de solubilização de fosfato dos 1219 isolados; H) Habitat dos 530 solubilizadores de fosfato. 35

Figura 6	Preparo de mudas: A) Estaquia do porta-enxerto GxN9; B) mudas do porta-enxerto 'GxN9' com dois meses de idade; C) mudas de <i>Dianthus barbatus</i> em bandeja plástica com solo esterilizado, 35 dias após a semeadura, mantidas em casa de vegetação.	48
Figura 7	Obtenção de explantes de pessegueiro 'GxN-9': A) Ramos jovens utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i> ; B) Estabelecimento de explantes em tubos; C) Estabelecimento de explantes em tubos acondicionados em câmara de crescimento; D) Brotações de explantes; E) Transferência dos explantes para frascos; F) Multiplicação dos explantes em frascos em câmara de crescimento.	50
Figura 8	Implantação do ensaio nematocida das bactérias sobre <i>M. xenoplax</i> em plantas de cravina: A) Câmara úmida em cada uma das unidades experimentais após a irrigação do solo com a suspensão bacteriana; B) Tratamentos após o plantio de uma muda de cravina por copo.	53
Figura 9	Colonização radicular de plântulas de pessegueiro 'GxN-9' microbiolizadas com bactérias: A) meio Gelrite®-água (0,7%) e isolado bacteriano DFs2008; B) meio ágar-água (0,4%) e isolado bacteriano DFs1986.	59

Lista de Tabelas

Tabela 1	Bactérias isoladas pelo método de diluição em placas a partir de solos de rizosfera e rizoplane de plantas de pessegueiro e <i>Tagetes</i> sp.	27
Tabela 2	Percentagem de bactérias produtoras de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento em função número de compostos produzidos e o total de isolados por agrupamento conforme a origem dos isolados bacterianos (figueira, gramíneas, leguminosas, liliáceas, pessegueiro, solo, tagetes e outros).	31
Tabela 3	Identificação dos isolados na coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal – UFPel; habitat do qual foram obtidas; produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC) e número total de isolados (NTI) em relação à PCRBPC.	45
Tabela 4	Percentual de mortalidade de <i>Mesocriconema xenoplax</i> devido a ação de 99 isolados bacterianos após 24h de incubação a 25°C.	55
Tabela 5	Número de isolados bacterianos biocontroladores em função do agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott, quanto ao percentual de mortalidade de <i>Mesocriconema xenoplax</i> após incubação a 25°C por 24 horas.	56
Tabela 6	Percentagem de inibição da eclosão de juvenis de <i>Mesocriconema xenoplax</i> submetidos à ação de 36 isolados bacterianos por 12 dias de incubação a 25°C.	57
Tabela 7	Número de isolados bacterianos biocontroladores em função do agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott, quanto ao percentual de inibição da eclosão de <i>Mesocriconema xenoplax</i> após incubação a 25°C por 12 dias.	58
Tabela 8	Incidência e intensidade de colonização radicular por bactérias em plântulas de pessegueiro ‘GxN-9’ cultivados <i>in vitro</i> e avaliados sete dias após a microbiolização com isolados bacterianos.	59
Tabela 9	Avaliação da taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) determinada seis meses após a deposição do nematoide <i>Mesocriconema xenoplax</i> ; massa fresca da raiz (MFR), fator de reprodução de <i>M. xenoplax</i> (FR),	

população final de nematoides de vida livre (PFTVL) em mudas de porta-enxerto de pessegueiros 'GxN-9' mantidas em casa de vegetação e submetidas a aplicação de diferentes isolados bacterianos e avaliadas oito meses após a deposição de *M. xenoplax*. 61

Tabela 10 Relação entre o potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC) e o total de isolados selecionados (TIU) com a mortalidade, eclosão e fator de reprodução (FR) de *Mesocriconema xenoplax* em pessegueiro menor do que a testemunha. 62

Tabela 11 População final de *Mesocriconema xenoplax* (PFT), população final total de nematoides de vida livre (PFVL), massa fresca da parte aérea (MFTPA) e número de brotações (NB) em plantas de *Dianthus barbatus*, originadas de sementes e com solo infestado com *M. xenoplax* e inoculado com bactérias, em condições de casa de vegetação e avaliadas aos 90 dias após o plantio. 63

Tabela 12 Relação das 15 bactérias que apresentaram inibição de eclosão de ovos de *Mesocriconema xenoplax* > 50% e a sua reação a cada um dos testes do potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento; colonização *in vitro* das raízes de explantes de pessegueiro 'GxN-9' (CR); fator de reprodução (FR) de *M. xenoplax* em mudas de 'GxN-9'; e, população final total (PFT) de *M. xenoplax* em cravina. 64

Sumário

1 Introdução	15
2 Isolamento e potencial biocontrolador de bactérias oriundas de diferentes nichos ecológicos	20
2.1 Introdução	20
2.2 Materiais e Métodos	22
2.3 Resultados	27
2.4 Discussão	36
2.5 Conclusões	39
3 Efeito antagonista de bactérias sobre <i>Mesocriconema xenoplax</i> em pessegueiro	40
3.1 Introdução	40
3.2 Materiais e Métodos	43
3.3 Resultados	54
3.4 Discussão	65
3.5 Conclusões	71
4 Conclusões	72
5 Referências	73
Apêndices	83
Anexos	86

1 Introdução

O pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) faz parte da família Rosaceae, subfamília Prunoidea, que inclui também as cerejeiras, ameixeiras, damasqueiros, amendoeiras, e espécies selvagens. A cultura do pessegueiro vem se expandindo em todo o mundo, impulsionada pelo aumento no consumo de frutos *in natura* e industrializados, sob a forma de sucos e enlatados, (IBRAF, 2009). Programas de melhoramento genético contribuíram decisivamente para esta expansão da cultura (EMBRAPA, 2005).

A China, centro de origem do pessegueiro, é o maior produtor mundial, enquanto o Brasil ocupa a 14^a posição, mas no MERCOSUL, ocupa o terceiro lugar, com área cultivada com pessegueiros e nectarinas de 20.194 ha e produção de 220.739 toneladas (FAO, 2012). Os principais estados produtores encontram-se nas regiões sul e sudeste, onde a cultura encontra as melhores condições para o seu desenvolvimento, especialmente no tocante ao clima, já que necessita de um determinado número de horas de frio para uma floração e brotação normais. O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional de pêssegos, com 67% da área cultivada (AGRIANUAL, 2011) e 53% da produção. De acordo com dados do IBGE (2012), em 2010, o RS produziu 132.874 toneladas de pêssegos e o município de Pelotas foi responsável por 15% da área cultivada no país.

As cultivares de pessegueiro desenvolvidas e utilizadas comercialmente apresentam grande potencial produtivo, além da adaptação para os climas temperado e subtropicais (RASEIRA; QUEZADA, 2003). Segundo Fachinello et al. (2011), o aumento de produtividade destas cultivares pode ser observado quando analisadas as safras do período de 1999 a 2009, a produção de pêssegos aumentou

em 64,69 %, porém a área colhida diminuiu em 15,39%, com um incremento na produtividade de 94,67 %. Apesar do aumento na produtividade, alguns problemas interferem na manutenção da produção, dentre eles, problemas fitossanitários e o tipo de porta-enxerto utilizado.

Entre os fitopatógenos que afetam o pessegueiro, destacam-se os nematoides. De acordo com Gomes; Campos (2003), os nematoides fitoparasitas prejudicam as plantas pela sua ação nociva sobre o sistema radicular, reduzindo a absorção e a translocação de nutrientes, podendo também predispor as plantas a outras doenças e estresses ambientais, além de atuar como transmissores de outros patógenos.

Mais de 30 espécies já foram encontradas parasitando a cultura do pessegueiro, algumas podendo tornar-se fator limitante para o cultivo desta frutífera se não controladas (WEHUNT; NYCZEPIR, 1988). Em pomares de pessegueiro no RS já foi detectados vários gêneros de nematoides, sendo a espécie *Mesocriconema xenoplax* (Raski, 1952) Loof & DeGrisse, 1989, o nematoide anelado do pessegueiro, uma das espécies mais amplamente disseminadas (CARNEIRO et al., 1993), sendo comumente associada a solos franco-arenosos e em locais onde pessegueiro ou outras frutíferas são cultivadas Kluepfel et al. (2002).

O nematoide anelado, que tem sido citado em alguns países, Brasil, México e Estados Unidos, como *Mesocriconema xenoplax* (Nemata: Criconematidae) (KLUEPFEL et al., 2002; MAYER et al., 2005, GOMES et al., 2010; LUNA-GUERRERO, 2011), também possui outras sinonímias, como *Macrophostonia xenoplax* (Raski) DeGrisse & Loof (WOUTS, 2006), *Criconemoides xenoplax* Raski (PERRY; MOENS, 2006), *Criconemella xenoplax* (Raski) Luc & Raski (NYCZEPIR; WOOD, 1998).

Os sintomas de *M. xenoplax* em pessegueiros podem ser observados pela presença de necroses e redução do número e volume das radículas; redução da altura das plantas e o diâmetro do tronco; redução da matéria fresca e seca da planta inteira e o número de frutos produzidos (NYCZEPIR et al., 1988). Em ameixeiras, além destes sintomas, Mojtahedi; Lownsbery (1975) observaram que o nematoide promoveu o escurecimento e a destruição dos tecidos corticais das raízes e verificaram redução nos níveis de nitrogênio, fósforo e potássio nas folhas da cv. Mariana 2624, além da elevação do estresse hídrico, provavelmente resultantes do

inadequado funcionamento das raízes. Além disso, existem evidências de que *M. xenoplax* interfere nos níveis de citocinina, nos níveis de clorofila e na senescência das folhas no outono (NYCZEPIR; WOOD, 1988).

Estas alterações na planta provocadas pelo nematoide anelado, juntamente com outros fatores como o baixo pH e fertilidade do solo, podas drásticas e/ou antecipadas, déficit ou excesso hídrico, deixam a planta vulnerável a mudanças bruscas de temperatura ou a ação da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (RITCHIE; CLAYTON, 1981). A soma destes fatores, os quais desencadeiam a morte parcial ou total da planta (CAMPOS et al., 2003), constituem a denominada síndrome da morte precoce do pessegueiro, também conhecida como Peach Tree Short Life (PTSL), que tem causado grandes prejuízos na região sul dos EUA (TAYLOR et al., 1978), similarmente ao que ocorre na região Sul do Brasil em pomares de pessegueiro (CARNEIRO et al., 1993; CARNEIRO, 1998; UENO, 2008) e ameixeira (GOMES et al., 2000). Porém, no Brasil, a manifestação da síndrome tem sido relacionada apenas a injúrias pelo frio, uma vez que não há relato de PTSL associado a *P. syringae* pv. *syringae* em *Prunus* spp.

Considerando os problemas que afetam a cultura do pessegueiro, o porta-enxerto e a qualidade da muda utilizada, aliado às práticas de manejo exercem um importante papel para o sucesso da produção desta frutífera (FACHINELLO et al., 2000). O uso de porta-enxerto tolerante ou resistente é uma das principais medidas para o manejo de *M. xenoplax*, principalmente porque no Brasil não há nenhum nematicida registrado para a cultura (AGROFIT, 2012). Na literatura, as cultivares Nemaguard e Lovell são relacionadas como tolerantes a *M. xenoplax*. Nos EUA, a cv. Guardian (BY520-9) tem sido o material mais usado efetivamente a nível de campo, diminuindo as perdas relacionadas a PSTL. Porém, por ser uma cv. protegida a sua utilização ainda não ocorre no Brasil (GOMES; CAMPOS, 2003).

Na região Sul do Brasil a maioria dos pomares comerciais de pessegueiro são constituídos de mudas cujos porta-enxertos são obtidos por meio de sementes provenientes da indústria de conservas, originando um material geneticamente desuniforme e com diferenças na reação aos fitonematoides e a outras doenças e pragas habitantes do solo (FACHINELLO et al., 2000).

Neste sentido, considerando-se as dificuldades acima abordadas sobre o controle do nematoide, o controle biológico aparece como um método alternativo ou

prática complementar na redução dos danos ocasionados pela síndrome da morte precoce do pessegueiro (McINNI; KLUEPFEL; ZEHR, 1990; KLUEPFEL; McINNIS; ZEHR, 1993; KLUEPFEL; NYCZEPIR, 2002). Uma alternativa para o controle de *M. xenoplax* é através do uso de microrganismos que habitam a rizosfera, já que este é o local onde o nematoide passa todas as fases do seu ciclo de vida (KLUEPFEL et al., 2002).

Os microrganismos que colonizam a rizosfera podem ser classificados de acordo com seus efeitos sobre as plantas e a forma como eles interagem com as raízes, sendo alguns patógenos, enquanto outros desencadeiam efeitos benéficos. Entre estes, as bactérias que habitam as raízes das plantas e exercem um impacto positivo, por meio de mecanismos de influência diretos ou indiretos, são denominadas de rizobactérias ou PGPRs (Plant Growth Promotion Rhizobacterias) (KLOEPPER et al., 1980). As quais têm sido utilizadas no controle de alguns fitopatógenos, dentre os quais os nematoides (ZEVALETA-MEJIA; VAN GUNDY, 1982).

As rizobactérias estão entre os organismos antagonistas mais propícios ao controle da população de fitonematoides (SIKORA, 1988) dentre seus mecanismos de ação estão àqueles que ocorrem por meio da indução de resistência (CHEN et al., 1995; KLOEPPER, 2004), como também pela produção de metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematoides ou a mobilidade e sobrevivência de embriões no interior de ovos ou ainda, inibir a eclosão de juvenis e o processo pelo qual eles penetram as raízes (STIRLING, 1991; OKA et al., 1993).

O controle de nematoides por rizobactérias pode ocorrer ainda por meio de competição por nutriente e por nichos ecológicos (KLOEPPER et al., 1980; ROMEIRO, 2007) e de forma direta sobre o nematoide (ENEBAK et al., 1998) pela produção de enzimas, como lipases (SANTIN, 2008) proteases (DUNNE et al., 1997) e quitinases (ZHANG; YUEN et al., 2000) e substâncias antimicrobianas produzidas pelas bactérias como os antibióticos (ROMEIRO, 2007).

Além dos benefícios diretos com o controle do patógeno, as rizobactérias têm sido amplamente citadas como promotoras do crescimento vegetal (KLOEPPER et al., 1990). Ganhos de produção em plantas anuais são amplamente relatados na literatura (BHARATI et al., 2004; LAZZARETTI; MELO, 2005), porém para perenes, o número de trabalhos ainda é reduzido, embora existam alguns com resultados

positivos (GARCIA et al., 2004). Os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento são a fixação de nitrogênio (VESSEY, 2003), solubilização de fosfatos (RICHARDSON, 2001), alterações benéficas no crescimento, na morfologia e no metabolismo do sistema radicular (VESSEY, 2003), mineralização de matéria orgânica (ROMEIRO, 2007) e controle biológico de enfermidades (ROMEIRO et al., 2007).

Sabendo-se que rizobactérias são bactérias que habitam a rizosfera e, ou o rizoplano de plantas, onde se multiplicam e sobrevivem (ROMEIRO, 2005) é neste ambiente que devem ser pesquisadas. De acordo com Cho Jae-Chang; Tiedji (2000), embora cepas exóticas de rizobactérias possam ser eficazes no controle de doenças e na promoção do crescimento, evidências baseadas em técnicas moleculares sugerem que bactérias benéficas possam ser endêmicas a um determinado espaço biogeográfico. Em trabalhos relacionados ao biocontrole do nematoide anelado, KLUEPFEL et al. (1993) após isolaram bactérias da rizosfera de pessegueiro em solo supressivo ao declínio precoce do pessegueiro e a *M. xenoplax*, verificaram a eficiência destes isolados em reduzir a população do nematoide anelado no solo. Mais tarde, KLUEPFEL et al (2002) verificaram o potencial da bactéria *Pseudomonas* sp. BG33R aplicada ao solo no controle de *M. xenoplax*, demonstrando a viabilidade efetiva desse agente no manejo de áreas infestadas pelo patógeno.

Devido às dificuldades enfrentadas no controle do nematoide anelado na cultura do pessegueiro e frente ao potencial biocontrolador de bactérias benéficas, esse trabalho teve por objetivo: primeiramente isolar bactérias da rizosfera e rizoplano de plantas de *P. persica* e conduzir testes de avaliação *in vitro* para investigar o potencial biocontrolador destes isolados e de mais 922 isolados obtidas de outros nichos ecológicos, a *M. xenoplax* e, posteriormente, avaliar *in vivo*, a efetividade das bactérias no controle do nematoide anelado e promoção do crescimento em pessegueiro.

2 ISOLAMENTO E POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE DIFERENTES NICHOS ECOLÓGICOS

2.1 Introdução

Existe um grande número de bactérias que se localizam na rizosfera, e estima-se que ocupem entre 7 a 15% da superfície total das (GRAY; SMITH, 2005). Estas bactérias que habitam as raízes de plantas e exercem efeitos positivos sobre as mesmas (ASGHAR et al., 2002) foram denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR) (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Os efeitos positivos das rizobactérias podem ocorrer por influência direta sobre a planta pelo aumento da solubilização e entrada de nutrientes, bem como, pela produção de sideróforos, agentes quelantes de ferro (BAKKER et al., 1991; DUIJF et al., 1993; MARIANO; SILVEIRA, 2005), indução de resistência sistêmica (CHEN et al., 1995; KLOEPPER, 2004) e toda gama de modificações da rizosfera capaz de permitir certo controle de fitonematóides (CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998), ou ainda, indiretamente, por meio da supressão de patógenos (SIDDIQUI, 2001).

Além disso, o controle de nematoides por bactérias pode ocorrer por meio de competição por nutrientes e nichos ecológicos (KLOEPPER et al., 1980; ROMEIRO, 2007), produção de enzimas, como lipases (SANTIN, 2008) proteases (DUNNE et al., 1997) e quitinases (ZHANG; YUEN et al., 2000), substâncias antimicrobianas (ROMEIRO, 2007) e compostos tóxicos que podem atuar como nematicidas e/ou afetar a mobilidade e/ou sobrevivência de embriões no interior de ovos, de juvenis e

de nematoides adultos enquanto outras podem inibir a eclosão de ovos (OKA et al., 1993).

Dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (LINDOW; LEVEAU, 2002). De acordo com Kishore, Pande; Podile (2005) bactérias que colonizam a parte aérea, filoplano, as quais são expostas a altas temperaturas e flutuações de umidade com disponibilidade de nutrientes limitada, poderiam ter melhor chance de sobreviver e se multiplicar em um ambiente rico nutricionalmente como o solo. Estes autores constataram que tanto bactérias do rizoplano como do filoplano tiveram efeito de PGPRs em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L) em condições de casa de vegetação.

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas podem ser isoladas nos solos e na rizosfera de inúmeras espécies de plantas (GRAY; SMITH, 2005). A seleção de PGPR de habitats diversos permite ampliar o espectro de PGPR e identificar as mais potentes (KISHORE, PANDE; PODILE, 2005). Além do incremento de parte aérea que pode ser promovido pelas PGPRs, também podem levar a um aumento substancial do sistema radicular. Esse aumento promove uma maior eficiência na absorção de água, macro e micronutrientes pelas plantas. Outro aspecto, é que as PGPRs apresentam efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos, podendo, portanto, promover um eficiente controle biológico de patógenos (ROMEIRO et al., 2007).

As bactérias que infectam fitonematoides, em geral, têm seu habitat na rizosfera; colonizam o sistema radicular e, portanto, é na rizosfera que devem ser obtidas (MELO; AZEVEDO, 1998). Para o controle de fitonematoides, o representante mais estudado é *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr que tem sido encontrado infectando mais de 200 espécies de nematoides (STIRLING, 1991). Porém, a utilização de rizobactérias no controle de diferentes espécies de nematoides tem recebido especial atenção nas últimas décadas (ZEVALETA-MEJIA; VAN GUNDY, 1982; WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; KLUEPFEL et al., 2002). Zevaleta-Mejia; Van Gundy (1982) foram os primeiros a relatar redução de danos causados pelo nematoide das galhas através da microbiolização de sementes por rizobactérias.

Ambientalmente, a utilização destes microrganismos pode ser preferível ao uso de fertilizantes e agrotóxicos por contribuir com um sistema agrícola sustentável e com a redução dos problemas associados ao uso de produtos químicos (CATTELAN; GRASSANO, 2007; AVIS et al., 2008; SOLANO et al., 2008).

Portanto, devido à necessidade de novos métodos para o controle de patógenos de *M. xenoplax*, considerando o potencial de biocontrole de algumas bactérias e em vista que a seleção de biocontroladores *in vivo* para um número elevado de candidatos é inviável, este estudo teve como objetivo isolar e avaliar *in vitro* por meio de testes o perfil de bactérias oriundas de diversos nichos ecológicos em relação ao seu potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento (PCRBPC) de plantas.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Origem dos isolados e do solo

Foram utilizadas 1.219 isolados bacterianos, das quais, 871 isolados já estavam armazenados na coleção pertencente ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV) do Departamento de Fitossanidade da UFPel, Pelotas – RS. Estes isolados foram agrupadas em seis grupos conforme ao seu ponto de origem; Figueira (55 isolados), Gramíneas (72 isolados), Leguminosas (151 isolados), Liliáceas (219 isolados), Outros (tomate, brássica, ipomea, poaia e contaminantes de meio de cultivo, 65 isolados) e Solo (309 isolados). Os demais isolados bacterianos foram obtidos neste trabalho, por meio do isolamento de solo e, de acordo com sua origem foram classificados em dois grupos Pessegueiro e Tagetes.

Para o isolamento de bactérias de solo sob cultivo de pessegueiro, os quais não apresentavam sintomas de morte precoce, foi obtido um total de 14 amostras. Destas amostras, quatro foram coletadas nos pomares de pessegueiro da Embrapa Clima Temperado (ECT), cinco de solo sob cultivo da cv. Ametista e cinco da cv. Turmalina, localizadas em pomares na colônia Maciel, interior de Pelotas. A coleta do solo foi realizada no entorno das raízes das plantas de pessegueiro e juntamente com o solo foram coletadas algumas porções das raízes das plantas.

O solo sob cultivo de *Tagetes* sp. foi coletado no Bairro Laranjal em Pelotas, RS, constituindo-se de solo e porções de raízes.

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e mantidas sob refrigeração a 4° C até a realização do isolamento.

2.2.2 Isolamento de bactérias

O solo rizosférico das amostras, coletadas no item 2.2.1, foi separado das raízes e homogeneizado, cada amostra em separado. Determinou-se como solo rizosférico àquele associado às raízes.

Para a condução do plaqueamento das amostras, de acordo com o método de diluição em placas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), 10g de solo rizosférico de cada uma das amostras foram suspensas em 90mL de solução salina (0,85% NaCl) e colocados sob contínua agitação, em agitador rotatório de plataforma, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizado a diluição seriada (fator 10), sendo plaqueadas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} , 100µL para cada placa de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970). As placas foram incubadas no escuro a 28°C por 48 horas.

Para o isolamento das bactérias localizadas no rizoplane, foram utilizados 10g de raízes de duas amostras, as quais foram trituradas em liquidificador juntamente com 90mL de solução salina (0,85% NaCl). O procedimento de diluição, plaqueamento e incubação foram semelhantes ao do solo.

Após o período de incubação, foram observadas as colônias bacterianas individualizadas e que apresentaram diferentes características morfológicas, como bordo, coloração, brilho, tamanho e elevação. Estas colônias foram repicadas para placas de Petri contendo Kado; Heskett (1970) e posteriormente para tubos de ensaio contendo o mesmo meio. Estes isolados receberam identificação através de um número seqüencial da coleção do LBV-UFPeL.

2.2.3 Manutenção dos isolados

Os isolados bacterianos foram repicados periodicamente (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) para meio 523 de Kado; Heskett (1970) e mantidos sob refrigeração a 4°C. A longo prazo, eles foram preservados em glicerol 20% (v/v) e mantidas em *freezer* (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

2.2.4 Avaliação dos 1219 isolados quanto à produção de compostos relacionados ao biocontrole e promoção do crescimento

2.2.4.1 Hidrólise de amido

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos isolados bacterianos de hidrolisar amido, foram repicados oito isolados por placa contendo o meio de amido a 0,2% com pH ajustado para 7,0 (MARIANO et al., 2005). As placas foram incubadas no escuro a 28°C por quatro dias.

A avaliação foi realizada com a adição de 1mL de solução de iodo (Lugol) em cada placa. A visualização de zonas claras ao redor da colônia bacteriana indicou hidrólise de amido.

Para mensuração da hidrólise, notas de 0 a 3 foram atribuídas. Nota zero indicou a ausência de hidrólise; nota 1, até 10 mm de raio; nota 2, de 11 mm a 20 de raio; e nota 3, acima de 21 mm de raio de hidrólise.

2.2.4.2 Produção de Amônia

Para avaliar a capacidade dos isolados de produzir amônia foi utilizada a metodologia descrita por Mariano et al. (2005). Para isto, cada isolado bacteriano foi repicado para um tubo de ensaio contendo meio constituído por caldo de peptona e incubados a 28°C por cinco dias. Como testemunha foi usado caldo de peptona sem a adição de bactéria.

Após o período de incubação foi adicionado 1mL do reagente de Nessler e observada a presença de um precipitado amarelo-alaranjado, o qual indica haver a produção de amônia no meio.

2.2.4.3 Produção de compostos antibióticos

A capacidade dos isolados bacterianos de produzir compostos antibióticos foi avaliada contra o fungo *Monilinia fructicola* (Winter) Honey, agente causador da podridão parda do pessegueiro e usado como modelo indicador.

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA (batata – dextrose – ágar) por um período de sete dias a 22°C. Após este período, um disco de micélio contendo o fungo foi retirado dos bordos de cultivo e disposto no centro de placas de Petri contendo meio KADO e HESKETT (1970) e em cada placa foram repicadas quatro isolados dispostas equidistantes nos bordos. Uma placa com o mesmo meio e apenas o fungo foi utilizada como testemunha. Estas placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12h luz/12h escuro a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias.

Após o período de incubação a avaliação foi realizada, atribuindo-se notas de 0 a 3, conforme descrito no item 2.2.4.1.

2.2.4.4 Solubilização de fosfatos

Para avaliar a capacidade dos isolados de solubilizar fosfato de cálcio, foi utilizado o meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL et al., 1999) com pH 6,0.

Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio e logo após, incubadas no escuro a 28°C até o final das avaliações, as quais ocorreram aos 7, 14 e 21 dias.

A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a solubilização do fosfato e o tempo decorrido para ocorrer a hidrólise determinou baixa (21 dias), média (14 dias) ou alta (7 dias) capacidade de produção de fosfatases por parte dos isolados.

2.2.4.5 Hidrólise de proteínas

Para avaliar o potencial proteolítico dos isolados foram utilizados dois substratos, Leite de Litmus[®] (Difco) e meio de gelatina a 5%.

A avaliação da capacidade dos isolados de hidrólise em Leite de Litmus[®] foi realizada em tubos contendo 5 mL do meio. Os isolados foram repicados para os

tubos, os quais, foram mantidos no escuro a 28°C por 10 dias. O tubo testemunha não recebeu adição de bactéria. Foram realizadas duas avaliações, aos quatro e dez dias, por meio da observação da alteração do meio de leitoso para translúcido, indicando a capacidade da bactéria de hidrolisar o substrato (SCHAAD et al., 2001).

De maneira similar, o potencial proteolítico dos isolados em meio contendo gelatina a 5% foi avaliado. Para isto, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de gelatina, conforme a metodologia de Mariano; Silveira (2005), os quais foram mantidos no escuro a 28°C durante 10 dias. No tubo testemunha não houve adição de bactéria. Foram realizadas duas avaliações, aos 4 e 10 dias. Para isto, os tubos foram colocados em geladeira a 4°C por 30 minutos e a capacidade de hidrólise de gelatina avaliada por meio da análise da alteração do estado do meio, sendo considerado resultado positivo aqueles tratamentos onde o meio se mostrou liquefeito e, negativo, aqueles onde o meio se mostrou sólido.

2.2.4.6 Hidrólise de quitina

O potencial de produção de quitinases dos isolados foi avaliado usando o meio de quitina a 0,5 %, cuja única fonte de carbono foi a quitina, de acordo com a metodologia descrita por Cattelan (1999).

Para a análise, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio de cultura e logo após, as placas foram incubadas no escuro a 28°C por 21 dias.

A capacidade de produção de quitinases pelos isolados foi avaliada em três períodos, aos 7, 14 e 21 dias, observando-se a presença de um halo translúcido ao redor da colônia bacteriana. O tempo decorrido para ocorrer a hidrólise determinou baixa (21 dias), média (14 dias) ou alta (7 dias) capacidade de produção de quitinases por parte dos isolados.

2.2.4.7 Hidrólise de lipídeos

Para avaliar a capacidade de hidrolisar lipídios, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura de Tween 80 a 1% e pH 7,4 (FAHY; PERSLEY, 1983), as placas foram mantidas no escuro a 28°C por sete dias.

As avaliações foram realizadas aos 4 e 7 dias. A hidrólise de lipídio foi verificada pela presença de um precipitado branco – leitoso ao redor das colônias.

2.3 Resultados

Foram isoladas 348 bactérias, das quais 267 foram obtidas de solo rizosférico, 30 do rizoplano de pessegueiro e 51 de solo rizosférico de *Tagetes* sp. (tab. 1, sequência DFs1888 a DFs2270).

Tabela 1 - Bactérias isoladas pelo método de diluição em placas a partir de solos de rizosfera e rizoplano de plantas de pessegueiro e *Tagetes* sp.

	LOCAL DE COLETA	ISOLADOS	TOTAL ISOLADOS
RIZOSFERA	Pessegueiro Embrapa	DFs1888 a DFs1920	32
	Pessegueiro cv. Ametista	DFs1949, 1952 a DFs1960 a DFs1983, DFs1985, DFs1986, DFs1989, DFs1990, DFs1992 a DFs2007, DFs2014 a DFs2020, DFs2022 a DFs2030, DFs2035 a DFs2040, DFs2042 a DFs2045, DFs2051 a DFs2062, DFs2064 a DFs2074, DFs2076 a DFs2082, DFs2113, DFs2115, DFs2117 a DFs2120, DFs2128, DFs2130 a DFs2135, DFs2198, DFs2200 a DFs2205	111
	Pessegueiro cv. Turmalina	DFs1936 a DFs1948, DFs1950, DFs2008 a DFs2013, DFs2031 a DFs2034, DFs2047 a DFs2049, DFs2083 a DFs2111, DFs2121 a DFs2126, DFs2136 a DFs2157, DFs2159 a DFs2185, DFs2189 a DFs2197, DFs2206 a DFs2210, DFs2270	124
	Tagetes	DFs2211 a DFs2229, DFs2231 a DFs2242, DFs2245 a DFs2252, DFs2254 a DFs2258, DFs2260, DFs2262, DFs2264 a DFs2267, DFs2269	51
RIZOPLANO	Pessegueiro Embrapa	DFs1921 a DFs1935,	15
	Pessegueiro cv. Turmalina	DFs1962 a DFs1978	15
Total			348

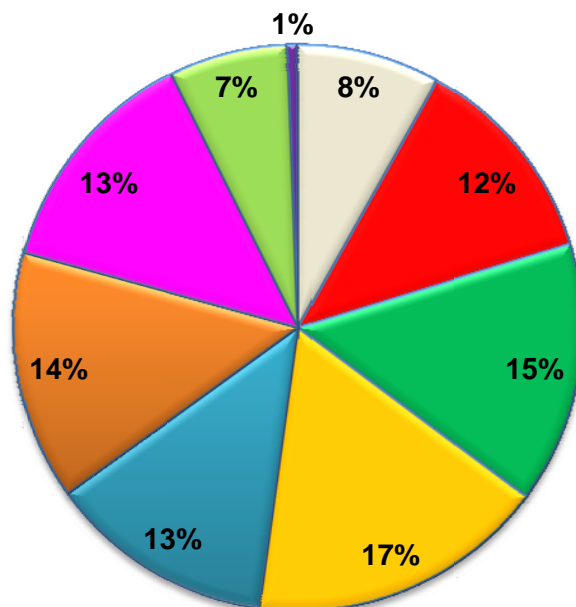
Dentre os 1219 isolados analisados, 92% foram capazes de produzir um ou mais dos oito compostos avaliados. Porém, apenas 1% dos isolados produziu todos os compostos (Fig. 1 A). Esta capacidade de produção de compostos apresentada pelas bactérias foi denominada: produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC), sendo que o maior número de bactérias (17%) apresentou uma PCRBPC igual a três (Fig. 1A).

Em relação ao comportamento geral dos 1219 isolados para cada um dos testes (Fig. 1B), pode-se observar que a atividade proteolítica foi a mais frequente entre os isolados e entre as duas metodologias testadas, a proteólise em gelatina foi mais frequente entre os isolados. Por outro lado, a hidrólise de quitina foi a atividade menos frequente entre os isolados. Nos demais testes, a frequência de isolados produtores dos compostos variou entre 36,34% (amido) a 49,55% (Tween).

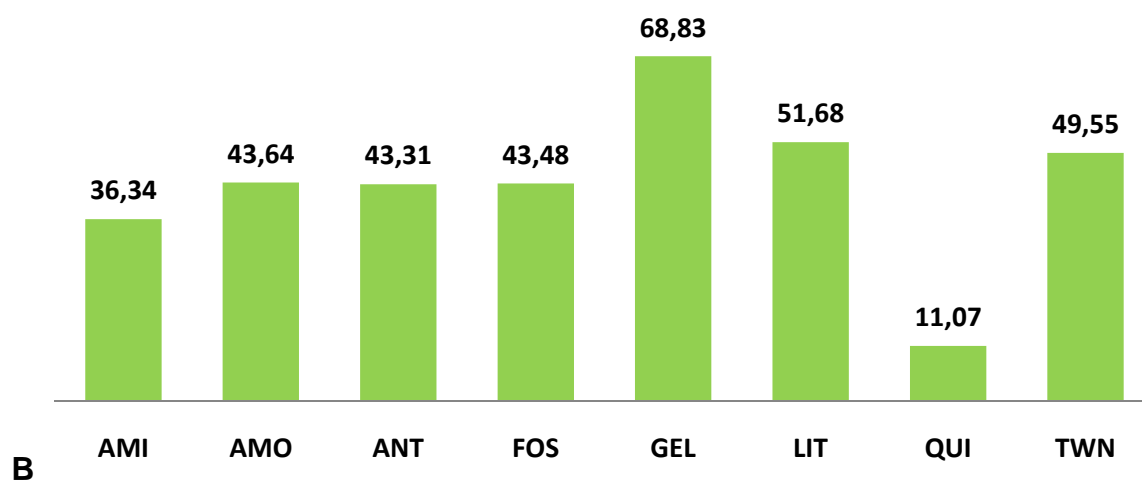
De forma geral, as metodologias utilizadas mostraram-se eficientes para as análises dos compostos (Fig. 2 A-H). mesmo com o reduzido número de isolados quitinilíticos e de certa dificuldade na visualização do halo de degradação para este teste (Fig. 2 G).

SOMATÓRIO

- ZERO
- UM
- DOIS
- TRÊS
- QUATRO
- CINCO
- SEIS
- SETE
- OITO



A



B

Figura 1 – Produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC). A) Percentual com base em oito testes; B) Percentagem total de isolados bacterianos reativos nos testes de amido, amônia, antibiose, fosfatase, gelatina, leite de Litmus, quitina e Tween.

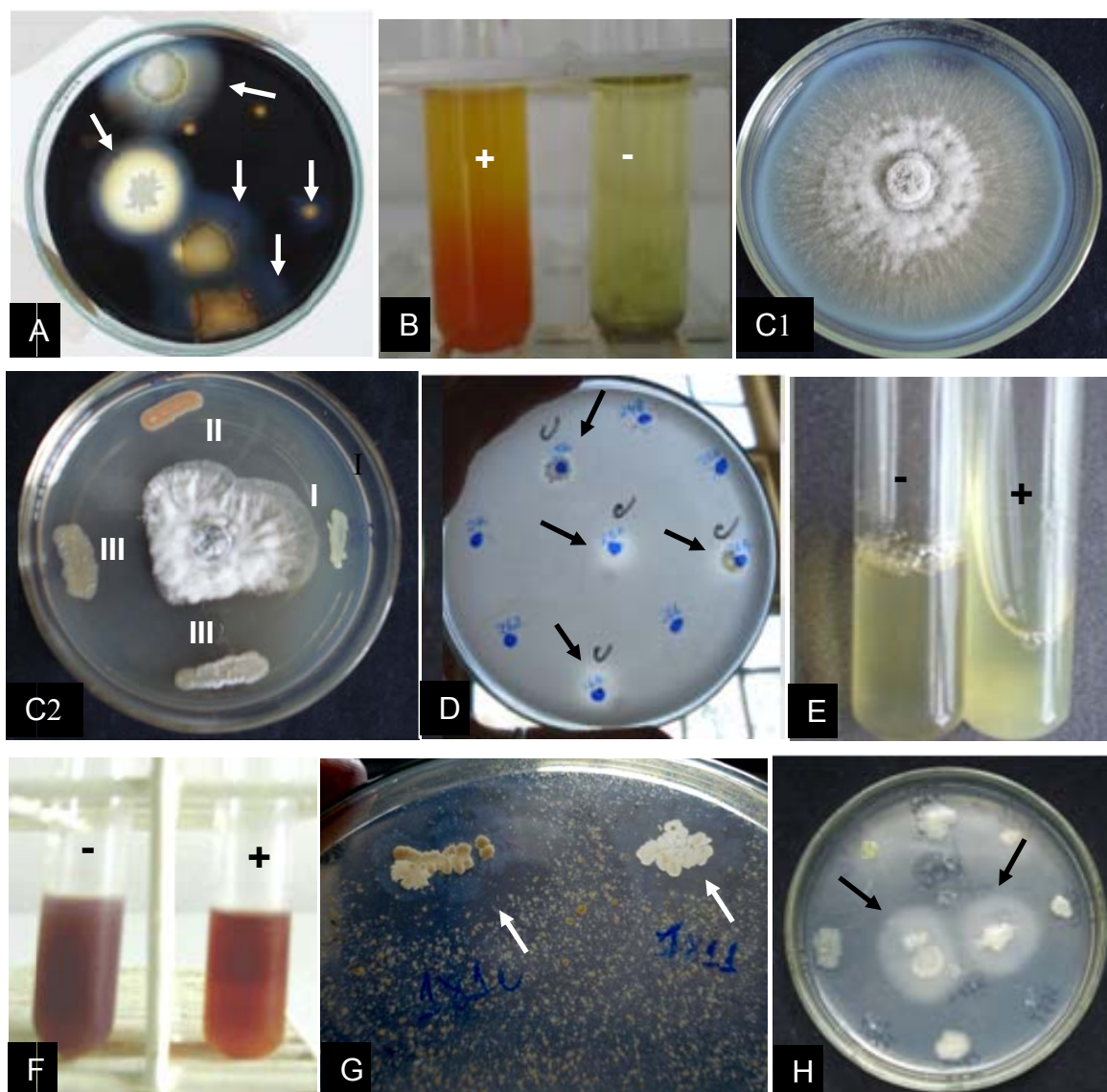


Figura 2 – Reação dos isolados bacterianos aos meios de análise em oito testes. A) atividade amilolítica; B) produção de amônia; C) antibiose contra *Monilinia fructicola* (C1 = testemunha; C2) = intensidade de inibição do crescimento micelial (I, II e III); D) solubilização de fosfato; E) atividade proteolítica em gelatina; F) atividade proteolítica em leite de Litmus®; G) atividade quitinolítica; H) atividade lipolítica em Tween 80.

De acordo com as análises por grupo de origem e o número de compostos produzidos (tab. 2), observou-se que 1,6% dos isolados bacterianos oriundos de solo foram os que apresentaram produção dos oito compostos avaliados, seguido por 1,4% de gramíneas e 0,3% de pessegueiro. Em contraste, o grupo de solo, também foi o que apresentou o maior número de isolados sem produção de nenhum dos compostos (11%), seguido por figueira (10,9%) e pessegueiro (10,8%). O grupo de isolados de tagetes foi o único em que 100% dos isolados apresentaram a produção de pelo menos um dos compostos.

Tabela 2 - Percentagem de bactérias produtoras de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento em função número de compostos produzidos e o total de isolados por agrupamento conforme a origem dos isolados bacterianos (figueira, gramíneas, leguminosas, liliáceas, pessegueiro, solo, tagetes e outros).

Grupo de Origem	Número de compostos produzidos (%)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Figueira (55)	10,9	18,2	23,6	14,5	9,1	10,9	9,1	3,6	0,0
Gramíneas (72)	8,3	11,1	16,7	15,3	11,1	6,9	20,8	8,3	1,4
Leguminosas (151)	7,9	13,9	17,9	7,9	12,6	15,9	17,9	6,0	0,0
Liliáceas (219)	2,3	6,4	8,2	16,9	13,7	19,2	17,8	15,5	0,0
Pessegueiro (297)	10,8	16,8	18,2	20,5	12,5	12,1	6,1	2,7	0,3
Solo (309)	11,0	12,0	11,0	17,5	12,9	14,6	13,9	5,5	1,6
Tagetes (51)	0,0	2,0	23,5	21,6	19,6	15,7	13,7	3,9	0,0
Outros* (65)	6,2	10,8	18,5	20,0	12,3	10,8	13,8	7,7	0,0

*Outros= tomate, brássica, ipomea, poaia e contaminantes de meio de cultivo

Comparando os oito grupos de origem dos isolados bacterianos (Fig. 3) é possível distinguir entre eles os que possuem os isolados com maior potencial de produção dos compostos avaliados. O grupo Tagetes apresentou o maior número de isolados produtores de proteases em gelatina, produtores de amônia, solubilizadores de fosfato e produtores de amilases. Os isolados bacterianos de Liliáceas foram os maiores produtores de proteases em Litmus[®] e antibiose contra *M. fructicola*. Os isolados bacterianos de Gramíneas mostraram-se os melhores produtores de lipases. E, os isolados de Leguminosas e do grupo de Outros foram os melhores produtores de quitinases (Fig. 3).

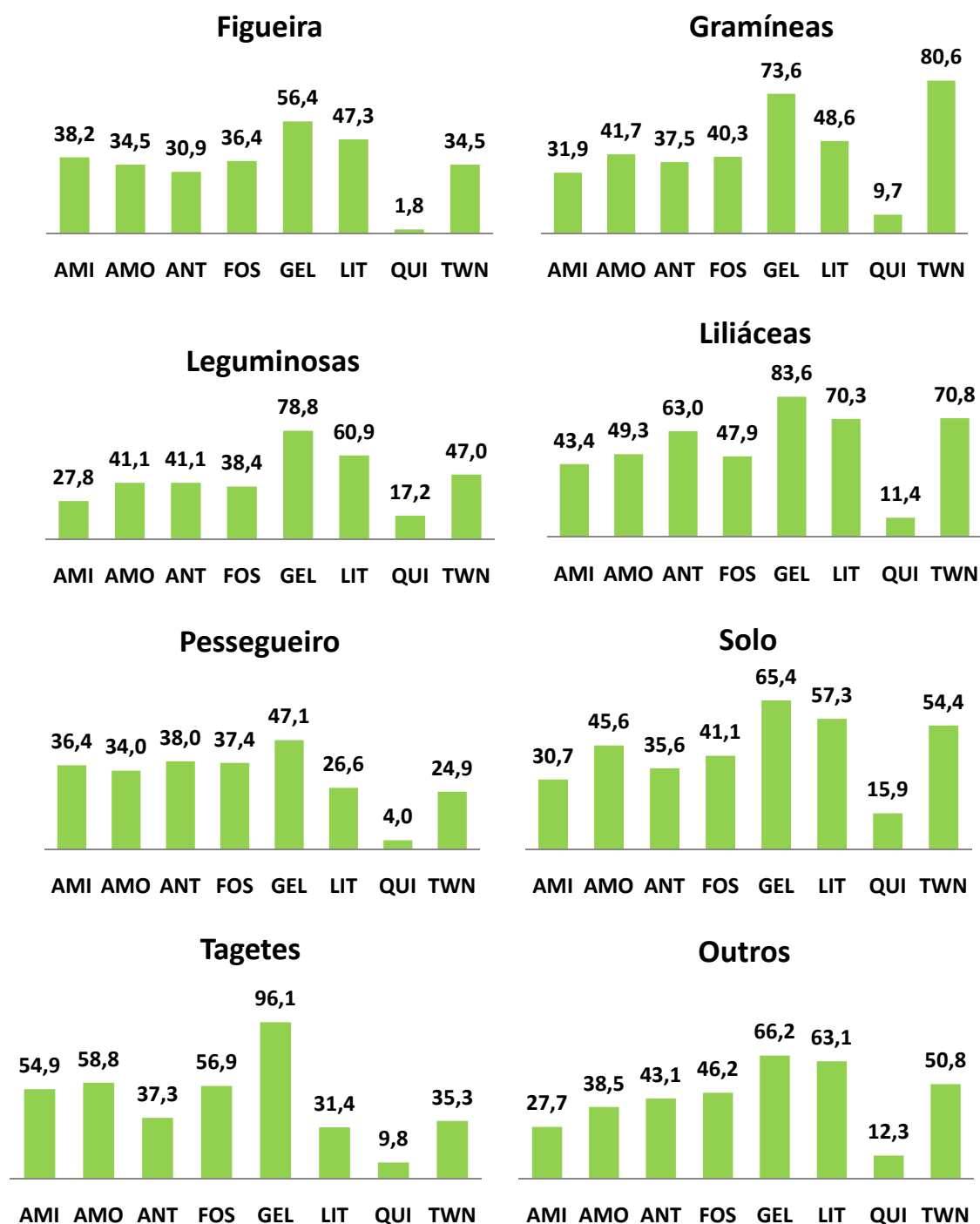


Figura 3 - Percentagem de bactérias produtoras de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento em função do número total de isolados por grupo habitat/hospedeiro. AMI = amido; AMO = amônia; ANT = antibiose; FOS = fosfatase; GEL = gelatina; LIT = Litmus®; QUI = quitina; TWN = Tween80.

Nas avaliações dos oito testes com os isolados bacterianos levou-se em consideração a intensidade da reação ou produção de compostos, a qual foi avaliada por meio de análises do tamanho do halo de degradação ou inibição (produção de amilase, lipase, atividade antibiótica, solubilização de fosfato), do tempo para a produção do composto (produção de proteases em gelatina e Litmus® e quitinases), alteração da coloração (produção de amônia) em diferentes períodos de avaliação, que foi sumarizado em negativo, baixo, médio e alta intensidade de produção.

Os resultados destas avaliações, de acordo com Fig. 4 e Fig. 5, relacionam a quantidade total de isolados analisados em relação à intensidade de cada um dos testes e também, em relação à origem destes isolados, dividida neste caso em Filoplano, Rizosfera e Solo. Nesta análise, observou-se que os isolados bacterianos foram mais eficazes produtores de proteases em gelatina e com reação proteolítica alta, aos quatro dias de avaliação (Fig. 4E) e destes isolados, o maior percentual tem como origem a rizosfera (Fig. 4F).

Seguindo a mesma lógica, de 52% de produtoras de proteases em Litmus®, o maior percentual apresentou proteólise alta, aos quatro dias (Fig. 4G) e a maioria dos isolados são provenientes da rizosfera (Fig. 5H).

Em relação aos isolados solubilizadores de fosfato, o maior percentual teve alta reação, aos sete dias (Fig. 5G) e destes, a maioria dos isolados são oriundos da rizosfera (Fig. 5H).

Com relação aos demais testes e a origem filosfera, rizosfera e solo, observou-se que houve uma distribuição semelhante dos isolados entre os três nichos.

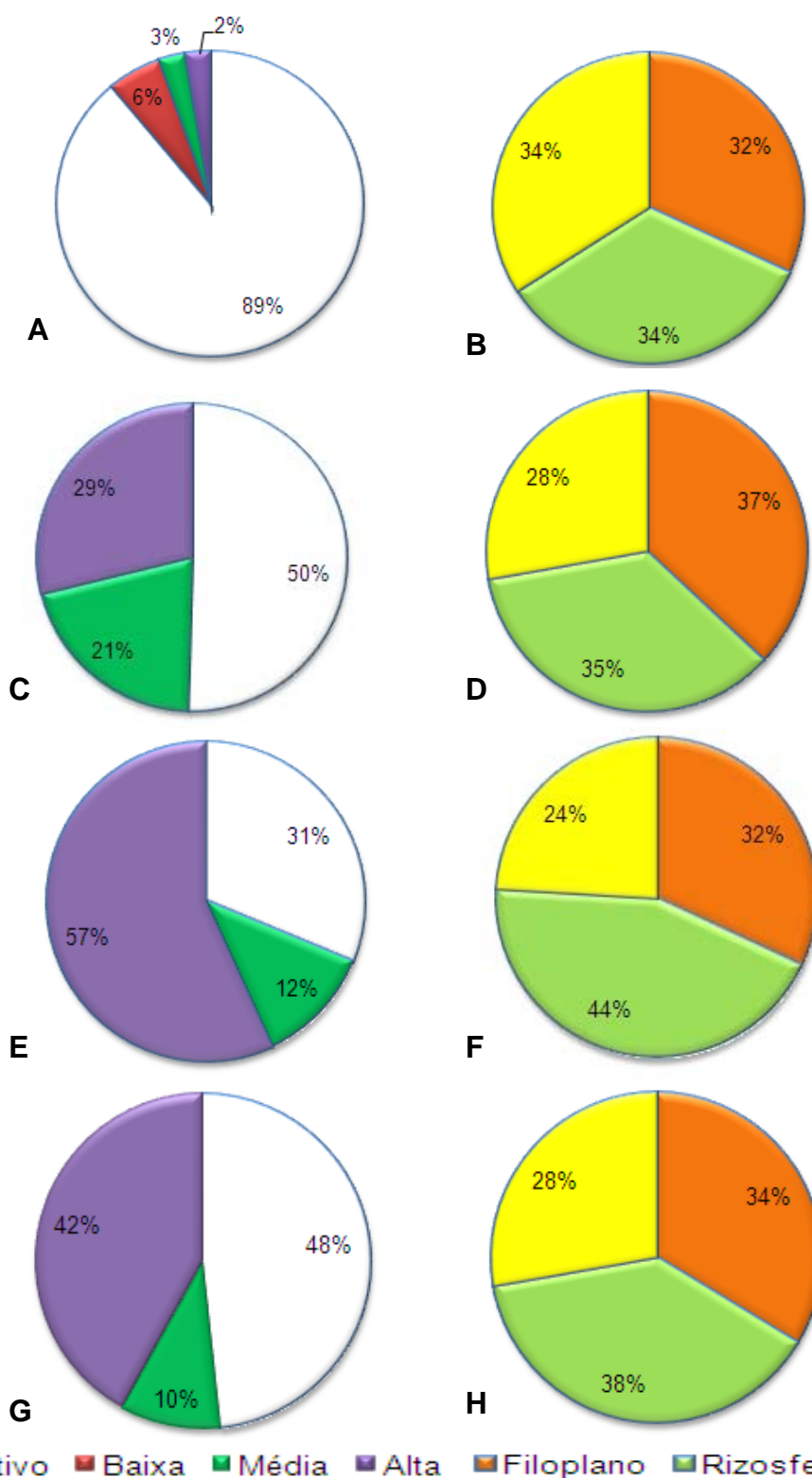


Figura 4 – A) Intensidade quitinolítica dos 1219 isolados; B) Habitat dos 135 isolados quitinilíficos; C) Intensidade lipolítica dos 1219 isolados; D) Habitat dos 604 isolados produtores de lipase; E) Intensidade proteolítica em meio de gelatina dos 1219 isolados; F) Habitat dos 839 isolados produtores de proteases em gelatina; G) Intensidade proteolítica em meio leite de Litmus[®] dos 1219 isolados; H) Habitat dos 630 isolados produtores de proteases em leite de Litmus[®].

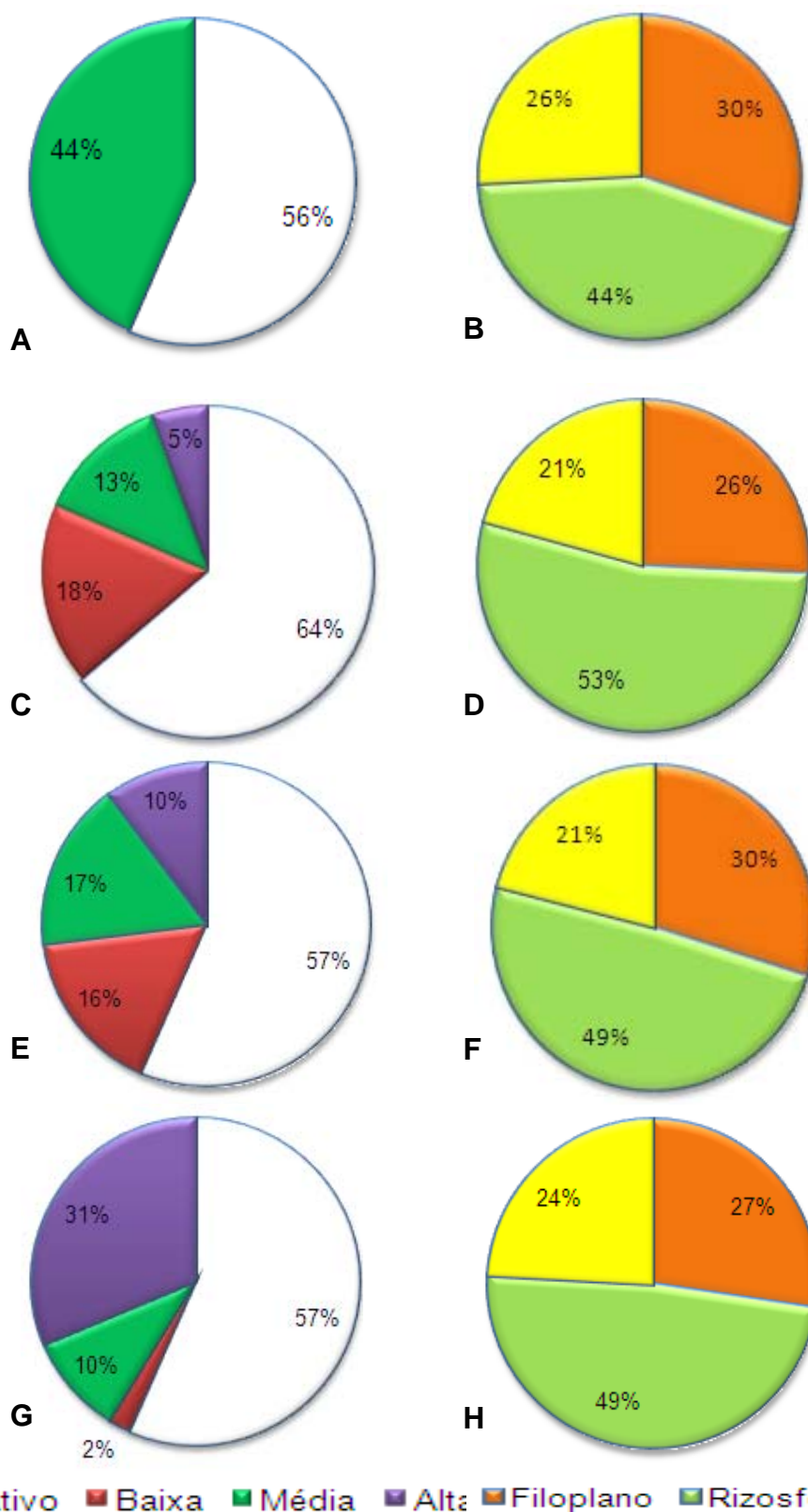


Figura 5 – A) Intensidade de produção de amônia dos 1219 isolados; B) Habitat dos 531 produtores de amônia; C) intensidade amilolítica dos 1219 isolados, D) Habitat dos 443 produtores de amilase; E) intensidade antibiótica dos 1219 isolados contra *Monilinia fructicola*; F) Habitat dos 529 produtores de antibióticos; G) intensidade de solubilização de fosfato dos 1219 isolados; H) Habitat dos 530 solubilizadores de fosfato.

2.4 Discussão

Para selecionarmos bactérias que possam atuar sobre os patógenos, o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes é de grande importância, principalmente quando se trabalha com plantas perenes e com a avaliação de um número elevado de candidatos (OLIVEIRA et al., 2003; MAZZOLA, 2004). Estas avaliações, além de possibilitarem a redução do número de isolados para que os testes *in vivo* se tornem viáveis, também possibilitam a seleção de isolados com um maior arsenal bioquímico para atuar sobre patógenos e enfrentar as condições adversas do solo, as quais, de acordo Sudharhsan et al. (2007), podem influenciar tanto no número como na atividade enzimática dos microrganismos.

De modo geral, todos os habitats avaliados demonstraram hospedar candidatos ao biocontrole, especialmente a rizosfera de tagetes, de onde todos os isolados produziram algum dos compostos analisados nos oito testes. Em estudos de bactérias da rizosfera de plantas antagonistas empreendidos por Kloepper et al. (1991;1992), verificou-se que isolamentos de raízes destas plantas podem aumentar em até seis vezes as chances de se encontrar bons candidatos em testes *in vivo*. *Tagetes* sp. é uma planta considerada antagonista a espécies de *Pratylenchus* e *Meloidogyne* (FABRY et al., 2007), porém relatos de antagonismo contra espécies de *Mesocriconema* não foram encontrados, o que torna interessante o estudo das bactérias associadas com tagetes, devido a possibilidade de aplicação desta planta no controle de mais de um patógeno de solo.

Entretanto, analisando os resultados dos testes com os isolados bacterianos de pessegueiro, observou-se que aproximadamente 90% dos isolados apresentaram algum tipo de composto ou atividade, as quais demonstram ser constitutivas, com exceção da antibiose que pode ter sido induzível. Considerando que plantas de pessegueiro são afetadas pelo nematoide anelado, biocontroladores oriundos deste habitat, se tornam desejáveis. De acordo com as pesquisas de McInnis; Kluepfel; Zehr (1990); Kluepfel et al (1993); Westcott; Kluepfel (1993) a seleção de isolados para o controle de nematoides realizada no próprio hospedeiro do parasita, tem demonstrado a obtenção de candidatos promissores e com potencial no controle do nematoide anelado.

Considerando os resultados por local de isolamento, na maioria dos oito grupos de origem, os isolados oriundos da rizosfera apresentaram maior produção dos compostos avaliados, bem como, maior intensidade e rapidez de reação aos testes utilizados. Foster (1986) destaca que a rizosfera é a região do solo sob influência direta da presença das raízes é nesta região que ocorrem à maioria das interações entre microrganismos e plantas e segundo Kloepper et al. (1990, 1993) reconhecida e amplamente estudada como local onde habitam inúmeras bactérias biocontroladoras de patógenos

A riqueza do ambiente rizosférico é responsável pela ocorrência e preferência de vários organismos. Segundo Bowen; Foster (1978) as bactérias que habitam a rizosfera se agregam principalmente nas regiões intercelulares da epiderme, por serem áreas de ativa exsudação e muitas delas apresentam efeito antagônico a vários patógenos, inclusive aos nematoides (ZAVALETA-MEJIA; VAN GUNDY, 1982). PARKER et al. (1988) atribuem esta capacidade das bactérias a uma variedade de mecanismos, como a produção de toxinas, enzimas proteolíticas, lipolíticas ou enzimas quitinolíticas.

Além da rizosfera, filoplano e solo também mostraram abrigar isolados bacterianos com potencial capacidade de biocontrole. De acordo com Andrews (1992), bactérias do filoplano têm sido identificadas como agentes de biocontrole do filoplano, mas também têm sido testadas contra patógenos de solo.

Em relação aos resultados dos testes líticos, o maior potencial de produção dos isolados foi para proteases e lípases. De acordo com Zhang, Sinclair (2000), a capacidade de produção de enzimas por parte de PGPRs é um fato comprovado. A atividade proteolítica tem demonstrado ser importante no controle biológico de nematoides (BERG et al., 2000; SHARON et al., 2001) e, algumas pesquisas demonstraram a atuação destes compostos sobre as membranas envoltórias de ovos e da cutícula de formas móveis de diferentes espécies de nematoides (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993).

Pouco mais de 10% dos isolados apresentaram produção de quitinases, podendo ser justificado pelas condições de pH do meio, bem como pela qualidade da quitina coloidal. Provavelmente estas bactérias não utilizam quitina como substrato, haja vista, serem poucos os microrganismos que produzem esta enzima. De acordo com Hsu; Lockwood (1975) a habilidade de hidrolisar o carboidrato

quitina é maior por parte de actinomicetos, sendo que poucas bactérias ou fungos de solo conseguem utilizá-la. As quitinases são importantes no controle de nematoides, pois a quitina é o principal constituinte da casca do ovo (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; DUNNE et al., 1998). Bactérias com estas características são potenciais biocontroladores de nematoide (HALLMANN e al., 1999).

Já é fato estabelecido que enzimas, principalmente as líticas, são sintetizadas por microrganismos, como também atuam como mecanismo de antagonismo e que, em muitas situações, esse mecanismo pode explicar, pelo menos em parte, o controle biológico de enfermidades de plantas promovido por alguns agentes procariotas (DUFFY et al., 2003). A produção de compostos antibióticos é considerada, por muitos autores, como um dos mais importantes mecanismos de antagonismo. Antibióticos e toxinas produzidos pelas bactérias podem atuar sobre a eclosão e desenvolvimento de nematoides (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; SAHARAN; NEHRA, 2011; FLEURI; SATO, 2005). Segundo Bettiol; Morandi (2009), a antibiose é sem dúvida uma característica desejável de um possível biocontrolador.

Em relação à atividade amilolítica apenas 5% apresentaram alta intensidade amilolítica dentre os 36% dos produtores. Segundo Oliveira et al. (2006a), ao estudarem em meios solidificados a capacidade de 67 isolados em produzir enzimas hidrolíticas, reportaram a atividade amilolítica como sendo a mais freqüente, ocorrendo em 1/3 das bactérias. Porém, Oliveira et al. (2006b) concluíram que a atividade amilolítica de alguns isolados estão sujeitas às variações de pH do meio sólido, com as maiores atividades ocorrendo em pH 6,5. Além disso, Oliveira et al. (2010), constataram que a atividade amilolítica é também diretamente dependente da temperatura. Condições as quais podem alterar os resultados de testes e devem ser consideradas.

Outra característica de grande importância de uma bactéria é sua capacidade de solubilizar fósforo, possibilitando o aumento nutricional da planta (PÉREZ et al., 2007). De acordo com os estudos, os danos de *M. xenoplax* em pessegueiro são agravados quando as plantas encontram-se em baixas condições de fertilidade do solo (RITCHIE; CLAYTON, 1981). Devido ao potencial de microrganismos solubilizadores, diversos estudos vêm sendo realizados (RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001), demonstrando que os microrganismos solubilizadores de

fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas e na promoção do crescimento e com a melhora nutricional, maior capacidade de resistir ao ataque de patógenos.

Conclui-se que o conjunto de testes utilizado permitiu selecionar um número significativo de bactérias com potencial biocontrolador de patógenos. Este potencial pode ser observado pela produção dos oito compostos analisados e relacionados ao biocontrole, bem como pela intensidade de reação apresentada.

2.5 Conclusões

A maioria dos isolados bacterianos mostram-se como eficientes produtores de proteases, dentre os demais compostos avaliados;

Os isolados bacterianos dos oito grupos de hospedeiros analisados possuem potencial biocontrolador;

A rizosfera demonstrou ser fonte de isolados promissores no controle biológico de doenças de plantas;

3 CAPÍTULO 2

EFEITO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS SOBRE *Mesocriconema xenoplax* EM PESSEGUEIRO

3.1 Introdução

O cultivo do pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) é realizado em vários Estados brasileiros da região Sul e Sudeste, mas a sua exploração comercial concentra-se, principalmente no Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Paraná, em ordem decrescente de volume produzido (EMBRAPA, 2005). A área cultivada com pessegueiros e nectarinas no Brasil é de 20.194 ha, com produção de 220.739 toneladas⁻¹ ano⁻¹ (FAO, 2012), sendo o Estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional de pêssegos, com 67% da área cultivada e 53% da produção (IBGE, 2012).

Dentre as pragas e doenças que afetam a produção de pessegueiro no Brasil, os fitonematoides assumem grande importância em virtude dos sérios prejuízos causados às plantas (RASEIRA; QUEZADA, 2003). Dentre esses, *Mesocriconema xenoplax* (Raski) Loof & de Grise (*Criconemella xenoplax*, *Criconemoides xenoplax*) ou nematoide anelado é a espécie mais disseminada na região de cultivo (CARNEIRO et al., 1993). O parasitismo por esse nematoide predispõe a planta de pessegueiro à injúria pelo frio e, nos Estados Unidos, ao cancro bacteriano causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall., a qual ainda foi encontrada associada ao pessegueiro no Brasil (GOMES; CAMPOS, 2003).

O nematoide anelado causa uma série de danos nas plantas de pessegueiro, os quais podem ser diretos ou indiretos. Os danos diretos correspondem às

necroses nas radículas e redução de sua quantidade e volume; redução da altura das plantas, da massa seca e do diâmetro do tronco; crescimento lento da planta, redução no número de frutos produzidos. Os danos indiretos, segundo Lownsbery et al. (1977) e Nyczepir et al. (1988) ocorrem devido ao enfraquecimento da planta, o qual a torna suscetível aos estresses bióticos e abióticos, entre estes, as oscilações de pH e temperatura, podas drásticas, o enxarcamento ou excesso de água, fatores os quais, juntamente com o ataque de nematoides predispõe a planta a síndrome da morte precoce do pessegueiro (Peach Tree Short Life - PTSL).

A correlação positiva entre as populações de *M. xenoplax* e os sintomas da síndrome de morte precoce é observada em plantas de pessegueiro (CARNEIRO et al., 1993) e de ameixeiras (*Prunus salicina* Lindl) (GOMES et al., 2000). Nos EUA, esta síndrome causa grandes prejuízos e é caracterizada por colapso e morte das plantas no fim do inverno e início da primavera, graças à drástica queda de temperatura que ocorre durante o inverno (TAYLOR et al., 1978), similarmente ao que ocorre na região Sul do Brasil (CARNEIRO et al. 1993; UENO, 2008).

Entre as estratégias de manejo de PTSL está a produção ou a aquisição de mudas livres de nematoides parasitas; o plantio em áreas livres de *M. xenoplax*; rotação de cultura com espécies más hospedeiras, por um período mínimo de dois anos e a desinfestação do solo com produto em pré-plantio (CARNEIRO et al. 1993).

O uso de porta-enxertos tolerantes é uma das principais medidas de manejo. Nos EUA, as cultivares 'Nemaguard' e 'Lovell' são relacionadas como tolerantes a *M. xenoplax* e nos últimos anos 'Guardian' tem sido o material mais usado efetivamente a campo, diminuindo as perdas relacionadas a PSTL (GOMES; CAMPOS, 2003). Porém, no Brasil são usadas como porta-enxertos, plantas oriundas de sementes provenientes da indústria de conservas, sem haver critério na seleção, originando um material com variabilidade genética e conseguinte desuniformidade das plantas, diferenças na reação aos fitonematoides e a outras doenças e pragas de solo (FACHINELLO, 2000). Além disso, o material padrão tolerante 'Guardian' é patenteado e o seu uso eleva os custos de implementação do pomar, o que tem dificultado a sua utilização no Brasil.

Em relação ao controle químico, segundo Nyczepir et al. (2009), nos EUA, existem dois produtos recomendados para o controle do nematoide anelado no pessegueiro em aplicação pré-plantio, 1-3-dicloropropeno e Vapam, os únicos

disponíveis desde a proibição de brometo de metila. No entanto, após dois anos da aplicação, as populações do nematoide crescem rapidamente, além de que os custos com este tipo de controle são elevados. No Brasil, até o momento não existe nenhum produto com ação nematicida registrado para a cultura do pessegueiro (AGROFIT, 2012), tornando-se praticamente utópico o uso de produtos químicos para o controle do nematoide anelado.

Por isto, métodos viáveis são alvo de inúmeras pesquisas e o controle biológico têm sido estudado em diversos patossistemas, incluindo o biocontrole de *M. xenoplax* em pessegueiro (McINNI; KLUEPFEL; ZEHR, 1990; KLUEPFEL; McINNI; ZEHR, 1993; KLUEPFEL et al., 2002; NYCZEPIR et al., 2004).

Dentre os microrganismos que podem atuar como biocontroladores de *M. xenoplax* estão as bactérias, especialmente as rizobactérias. As quais habitam a rizosfera proporcionando efeito benéfico às plantas (KLOEPPER; SCHROTH, 1978) e são capazes de, ao colonizar o sistema radicular de plantas, exercerem o biocontrole e promoverem crescimento vegetal (KLOEPPER; BEAUCHAMP, 1992). Estas bactérias têm sido avaliadas no biocontrole de fitonematoides (ZEVALETA-MEJIA; VAN GUNDY, 1982) através da aplicação direta nas raízes das plantas, bem como através da peletização (SIKORA, 1988) e microbiolização das sementes (BECKER et al., 1988).

De acordo com Sikora (1988), as rizobactérias estão entre os organismos antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematoides devido a sua localização e capacidade de limitar a penetração dos nematoides nas raízes por meio de uma série de mecanismos. Entre os quais, segundo Stirling (1991), esta a produção de metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematoides ou inibem a eclosão de juvenis, ou ainda, interferem no processo pelo qual eles penetram as raízes.

Outros mecanismos de ação das rizobactérias é por meio da produção antibióticos (WHIPPS, 2001), enzimas, como lipases (SANTIN, 2008) e proteases (DUNNE et al., 1997) que podem agir sobre a cutícula do nematoide, ou a produção de quitinases (HALLMANN e al., 1998) as quais podem interferir na quitina da casca do ovo e conseqüentemente na eclosão dos nematoides; bem como através da produção de fosfatases (PÉREZ et al., 2007) as quais promovem a liberação de

fósforo e com isto melhoram o estado nutricional das plantas, tornando-as menos suscetíveis a estresses.

Ensaio *in vitro* têm demonstrado os efeitos destes metabólitos sobre a eclosão e mortalidade de diversos gêneros e espécies de nematoides, inclusive sobre *M. xenoplax*, que apresentou redução na eclosão de ovos quando submetidos a tratamento com *Pseudomonas aureofaciens* BG33 (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993). Posteriormente, KLUEPFEL et al (2002) verificaram o potencial da bactéria *Pseudomonas* sp. BG33R aplicada ao solo no controle de *M. xenoplax*, demonstrando a viabilidade efetiva destas rizobactérias no manejo de áreas infestadas pelo patógeno.

Considerando-se as dificuldades de manejo de *M. xenoplax*, o controle biológico pode representar uma alternativa de controle. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antagonista de bactérias com potencial biocontrolador sobre *M. xenoplax* em mudas de porta-enxerto de pessegueiro.

3.2 Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se as dependências dos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade - Laboratório de Bacteriologia Vegetal; Departamento de Fisiologia Vegetal – Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Pelotas – UFPel e, da Embrapa Clima Temperado – Laboratório de Fitopatologia.

3.2.1 Isolados bacterianos e obtenção das suspensões

Considerando o local de isolamento e a produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC), a partir de 1.219 isolados bacterianos, 99 isolados foram selecionados, sendo que dentre estes, sete isolados foram escolhidos para efeito contrastante (tab. 3 e Apêndice 2).

Os isolados bacterianos foram repicados periodicamente (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) em meio 523 de Kado; Heskett (1970) e mantidos sob refrigeração a 4°C. Para preservação a longo prazo, as culturas foram emulsificadas em glicerina (20%) e mantidas em freezer (ROMEIRO, 2001).

Para a obtenção das suspensões bacterianas utilizadas em testes, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubados a 28°C por 48 horas. Após este período, as colônias bacterianas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e padronizadas em espectrofotômetro para $A_{540}=0,5$.

Tabela 3 – Identificação dos isolados na coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal – UFPel; habitat do qual foram obtidas; produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC) e número total de isolados (NTI) em relação à PCRBPC

Isolados	Habitat	PCRBPC*	NTI* *
DFs1963, DFs1949, DFs2091, DFs2180	Pessegueiro	1	4
DFs1941	Pessegueiro	2	2
DFs2239	Tagetes		
DFs0223	Outros	3	1
DFs1939, DFs2053, DFs2133	Pessegueiro	4	5
DFs0185, DFs0306	Outros		
DFs1899, DFs1902, DFs1909, DFs1928, DFs1932, DFs1935, DFs1950, DFs1955, DFs1958, DFs1970, DFs1998, DFs2008, DFs2027, DFs2051, DFs2060, DFs2089, DFs2099, DFs2109, DFs2113, DFs2123, DFs2136, DFs2147, DFs2148, DFs2155, DFs2168, DFs2193	Pessegueiro	5	29
DFs2250	Tagetes		
DFs0418; DFs1650	Outros		
DFs1923, DFs1934, DFs1983, DFs2007, DFs2048, DFs2052, DFs2062, DFs2110, DFs2122, DFs2126, DFs2156, DFs2162, DFs2172, DFs2175, DFs2191	Pessegueiro	6	23
DFs2227, DFs2229, DFs2236, DFs2246, DFs2265	Tagetes		
DFs0032, DFs0422; DFs1691	Outros		
DFs1947, DFs1967, DFs1985, DFs2049, DFs2108, DFs2121, DFs2124, DFs2137	Pessegueiro	7	32
DFs2247, DFs2251	Tagetes		
DFs0390, DFs0582, DFs0886, DFs1021, DFs1039, DFs1219, DFs1256, DFs1341, DFs1344, DFs1887	Solo		
DFs0023, DFs0066, DFs0081, DFs0377, DFs0419, DFs0439, DFs0695, DFs0706, DFs0756, DFs1258, DFs1320, DFs1421	Outros		
DFs1986	Pessegueiro	8	3
DFs1391; DFs1486	Solo		
TOTAL:			99

*PCRBPC = Produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (produção de amônia, antibiose, solubilização de fosfato, atividade proteolítica em gelatina e leite de Litmus, atividade lipolítica, amilolítica e quitinolítica)

**NTI = N° isolados

Solo sob cultivo de = arroz, figueira, feijão

Outros = Arroz, contaminantes meio de cultivo, cebola, feijão, tomate

3.2.2 Obtenção do inóculo de *Mesocriconema xenoplax*

Para a condução dos testes *in vitro* (mortalidade e eclosão do nematoide) e *in vivo* (efeito antagônico de bactérias sobre *M. xenoplax* em pessegueiro e efeito nematicida da bactéria no solo sob cultivo de cravina), população pura de *M. xenoplax* foi multiplicada em plantas de pessegueiro suscetível (cv. Capdeboscq) (CARNEIRO et al., 1998) e cravina (*Dianthus barbatus* Sweet William) também suscetível, conforme comunicação pessoal de ¹RADMAN (2010) e mantidas em vasos com solo franco arenoso em casa de vegetação e com regas diárias.

Apenas as plantas destinadas a multiplicar o nematoide anelado para o teste de eclosão, foram cultivadas em solo esterilizado e irrigadas com água destilada, com a intenção de reduzir a presença de ovos de nematoides de vida livre. A extração de nematoides de solo foi realizada através de metodologia de flutuação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964), utilizando peneiras de 60 e 400 mesh, enquanto para a extração de ovos foram utilizadas as peneiras de 60 e 500 mesh.

3.2.3 Material Vegetal

O material vegetal para a condução dos testes com pessegueiro foi coletado de plantas de pessegueiro 'GxN-9' (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*), suscetível a *M. xenoplax*, conforme comunicação pessoal de ²BIANCHI (2009), cultivadas no Centro Agropecuário da Palma – UFPel.

Para a avaliação da capacidade de colonização *in vitro* de bactérias em raízes de pessegueiro, mudas do porta-enxerto 'GxN-9' foram cultivadas e quando emitiram brotações vigorosas, receberam tratamento com Kasumin[®] (30 mL/10L água) por um período de 30 dias. Na primeira quinzena de tratamento as plantas foram mantidas em casa de vegetação, na segunda quinzena, em câmara de crescimento, Fitotron[®], com temperatura diurna em torno de 25°C e noturna de 20°C. Após este período, as brotações foram coletadas e acondicionadas em frascos âmbar estéreis, armazenados em caixa de isopor com gelo e transportadas até o laboratório de cultura de tecidos.

¹ Comunicado pessoal da Dr^a Elizete Radmann à autora, março de 2010;

² Comunicado pessoal do Dr^o Valmor João Bianchi à autora, agosto de 2009.

O material vegetal utilizado para o experimento de antagonismo *in vivo* em plantas de pessegueiro, foi coletado de plantas de pessegueiro 'GxN-9' e a produção das mudas foi realizada na casa de vegetação, usando estacas herbáceas, as quais, foram submetidas a imersão da base em 500 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB) por dez segundos, para estimular o enraizamento. Em seguida, foram acondicionadas em bandejas de isopor de 96 células contendo vermiculita média esterilizada. As bandejas foram mantidas em câmara com alta umidade e temperatura em torno de 25 ± 2°C (Fig. 6A).

Após o enraizamento, as mudas foram transplantadas para sacos de polietileno de 2 litros contendo substrato esterilizado (solo, areia, vermiculita, 2:1:1) e mantidas em câmara com alta umidade por mais sete dias. Decorrido este período as mudas de pessegueiro foram mantidas em casa de vegetação até serem transplantadas para vasos (Fig. 6B).

Para avaliação do efeito nematicida no solo sob cravina, 200 mg de sementes foram semeados em bandeja plástica (38x50x8,5 cm), contendo 3 kg de solo autoclavado. As mudas foram irrigadas diariamente e mantidas em casa de vegetação (Fig. 6C).

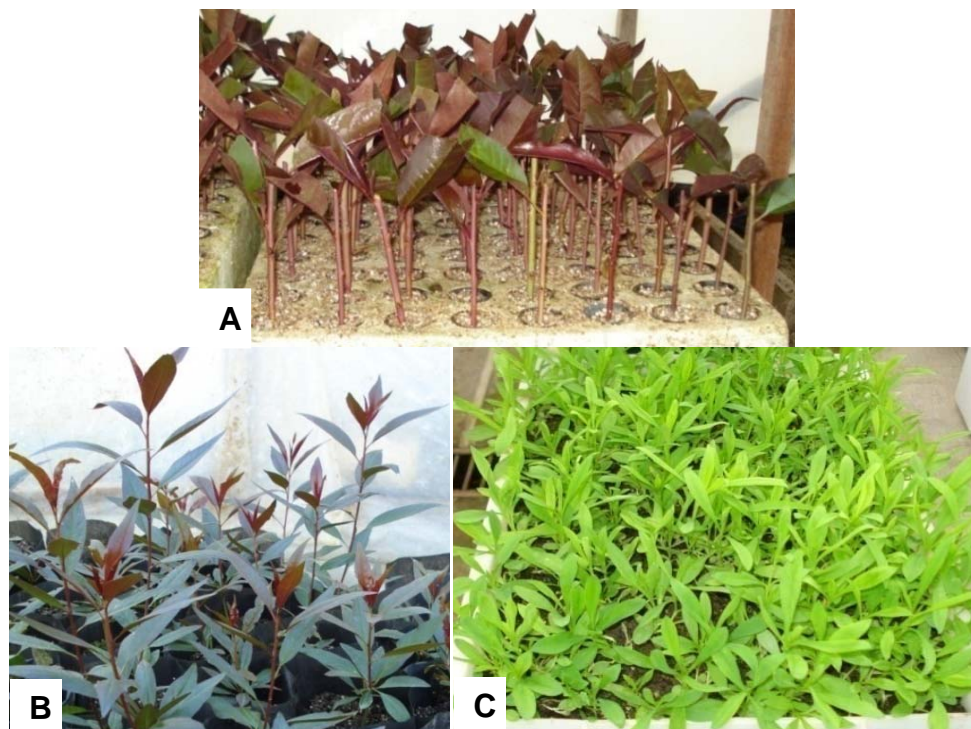


Figura 6 – Preparo de mudas: A) Estaquia do porta-enxerto GxN9; B) mudas do porta-enxerto 'GxN9' com dois meses de idade; C) mudas de *Dianthus barbatus* em bandeja plástica com solo esterilizado, 35 dias após a semeadura, mantidas em casa de vegetação.

3.2.4 Avaliação do efeito nematicida *in vitro* de isolados bacterianos sobre *Mesocriconema xenoplax*

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação e em cada orifício da placa, foram adicionados 20µL de suspensão aquosa contendo 25 formas jovens ou adultas de *M. xenoplax*, 50µL de suspensão bacteriana e 30µL de solução salina (0,85%) para completar um volume total de 100µL. Como testemunha, foi utilizada a mesma suspensão, exceto que pela substituição da suspensão bacteriana pela solução salina. A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico, envoltas com papel alumínio e mantidas a 25°C, na ausência de luz, por 24 horas. O ensaio seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com 99 tratamentos bacterianos, com quatro repetições por tratamento, em que cada orifício da placa foi considerado uma repetição.

Avaliou-se, sob microscópio estereoscópico, o número de nematoides mortos para a determinação da porcentagem de mortalidade. No momento da avaliação, em cada cavidade foram adicionado 10µL de NaOH 1N, conforme adaptação da

metodologia proposta por Chen; Dickson (2000), caracterizando-se como mortos, os nematoides que permaneceram com o corpo completamente distendido e sem movimento, três minutos após a adição do NaOH. Posteriormente, os valores de percentagem de mortalidade de *M. xenoplax*, foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de Scott; Knott (1974) pelo programa SASM (CANTERI et al., 2001).

3.2.5 Avaliação *in vitro* do efeito dos isolados bacterianos sobre a eclosão de ovos de *Mesocriconema xenoplax*

As bactérias que resultaram em mortalidade acima de 95% no ensaio anterior (item 3.2.4) foram testadas *in vitro* quanto à inibição da eclosão de juvenis de 2º estágio de *M. xenoplax*. O ensaio foi conduzido de forma similar à descrita para o efeito nematicida, porém, como inóculo de *M. xenoplax*, utilizou-se uma suspensão de ovos extraídos do solo conforme item 3.2.2. A seguir, o material foi vedado com papel alumínio e mantido por 12 dias a 25°C.

O ensaio seguiu o delineamento inteiramente casualizado e constou de 36 tratamentos bacterianos e quatro repetições, em que cada orifício da placa foi considerado uma repetição.

Avaliou-se o número de juvenis de *M. xenoplax* eclodidos e o número de ovos não eclodidos. Posteriormente, os valores de percentagem de eclosão de *M. xenoplax*, foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de Scott; Knott (1974) pelo programa SASM (CANTERI et al., 2001).

3.2.6 Avaliação da colonização *in vitro* de raízes de pessegueiro por bactérias

3.2.6.1 Estabelecimento dos explantes

O material vegetal para estabelecimento *in vitro* foi obtido conforme item 3.2.3. Em laboratório, as brotações receberam desinfestação superficial com uma suspensão de álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio a 2% com uma gota de Tween® por 15 minutos e então, foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada. Em seguida, as brotações foram seccionadas e acondicionadas em

tubos de ensaio contendo o meio de cultivo WPM - Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g de sacarose, 8 g de ágar, e pH ajustado para 5,8. Os tubos com os explantes foram mantidos no escuro por sete dias, após foram transferidos para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, luminosidade de 25 µmol s⁻¹.m⁻² com temperatura de 25 ± 1° C (Fig. 7A, e B).

Quando as brotações emergiram (Fig. 7C), os explantes foram induzidos à multiplicação, sendo transferidos para o meio WPM suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g de sacarose, 8 g de ágar, acrescido de 0,3 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina e 0,02 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico, em pH ajustado para 5,8. Após quatro subcultivos os explantes foram induzidos ao enraizamento, pelo uso do meio WPM preparado de modo semelhante ao meio de multiplicação e acrescido de 1,5 mg.L⁻¹ de AIB (RADMANN et al., 2009) (Fig. 7D e E, F).

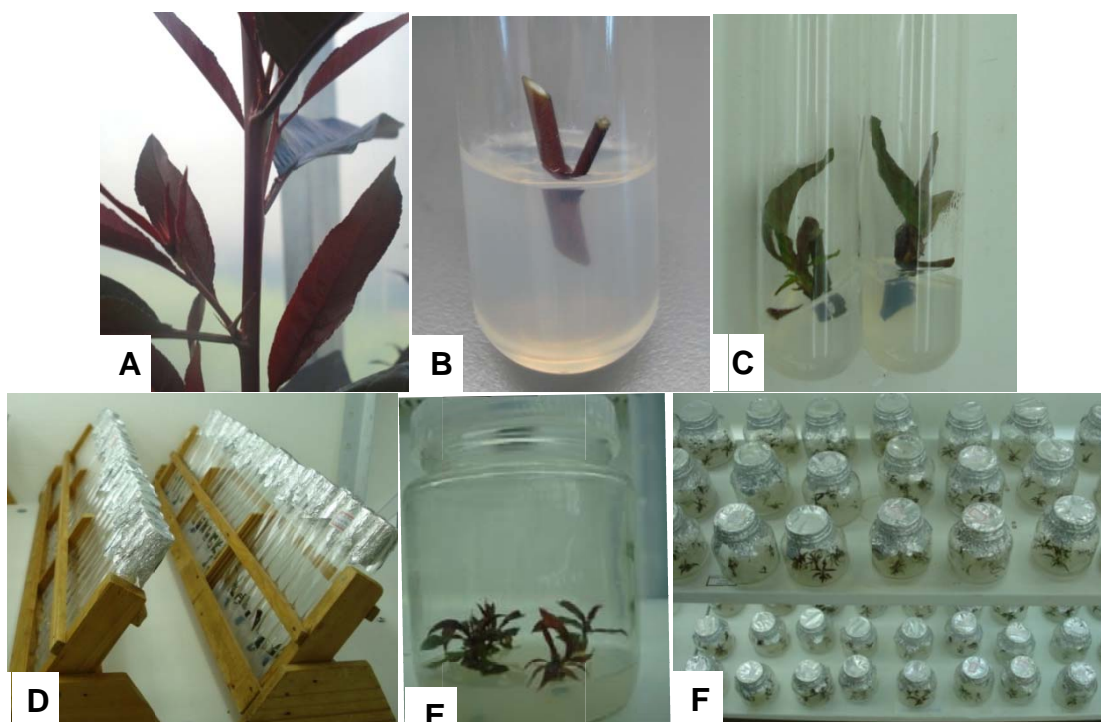


Figura 7 – Obtenção de explantes de pessegueiro ‘GxN-9’: A) Ramos jovens utilizados para estabelecimento *in vitro*; B) Estabelecimento de explantes em tubos; C) Estabelecimento de explantes em tubos acondicionados em câmara de crescimento; D) Brotações de explantes; E) Transferência dos explantes para frascos; F) Multiplicação dos explantes em frascos em câmara de crescimento.

3.2.6.2 Avaliação da colonização das raízes de pessegueiro por bactérias

A partir dos explantes de pessegueiro enraizados, procedeu-se a sua microbiolização com 15 bactérias selecionadas com base nos testes de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento e avaliações do efeito nematicida e nematostático sobre *M. xenoplax*. Para tanto, cada explante foi submetido a três lavagens com água destilada autoclavada para retirar resquícios de meio de cultivo ainda presentes nas raízes. Os explantes foram submetidos à microbiolização pela imersão radicular em uma suspensão bacteriana $A_{540}=0,5$ (0,85% solução salina), por 30 minutos e sob agitação contínua.

Os explantes microbiolizados foram transferidos para meio ágar/água a 0,4%, e meio Gelrite® (Sigma) a 0,7%, sem adição de quaisquer fontes de carbono e nitrogênio. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo a testemunha imersa apenas em solução salina.

A avaliação da colonização foi realizada pela observação da presença ou não de turvação do meio ao redor das raízes. Foram atribuídas notas de 0 a 3, em que 0 = nenhuma colonização, 1 = colonização até 1/3 das raízes, 2 = colonização de 1/3 até 2/3 das raízes e 3 = colonização acima de 2/3 até a totalidade das raízes, Habe; Uesugi (2000) (anexo A).

3.2.7 Avaliação do antagonismo bacteriano sobre *Mesocriconea xenoplax* em pessegueiro

Mudas do porta-enxerto de pessegueiro 'GxN-9', obtidas conforme descrito em 3.2.3, foram transplantadas para vasos com capacidade para 8 litros contendo 7 kg de solo autoclavado.

Para este experimento, foram utilizados 15 isolados bacterianos selecionados pelo desempenho nos testes de mortalidade e inibição da eclosão de ovos do nematoide. As suspensões foram preparadas em solução salina a 0,85%, com densidade ótica de $A_{540}=0,5$, conforme item 3.2.1. A primeira inoculação bacteriana foi realizada no transplante das mudas, utilizando-se 500 mL da suspensão de cada isolado por vaso, volume suficiente para que o solo atingisse 60% de sua capacidade de campo. Nos tratamentos testemunha com nematoide e sem nematoide, foram adicionados 500 mL de água de abastecimento público. Após 15

dias da primeira aplicação, foi realizada nova inoculação bacteriana, nas mesmas condições.

A inoculação do nematoide, ocorreu aos sete dias da segunda aplicação do inóculo bacteriano, pela deposição de 10 mL de uma suspensão aquosa contendo 2.000 *M. xenoplax* jovens e adultos, obtidos conforme o item 3.2.2. Como testemunhas, plantas de pessegueiro, foram inoculadas somente com o nematoide (controle positivo) ou receberam apenas água (controle negativo). A seguir, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por seis meses. O experimento seguiu o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições de uma planta para cada tratamento.

Foi avaliada a taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) de cada planta pela relação entre a altura (cm) da parte aérea da planta aos 180 dias da inoculação e a altura da parte aérea inicial. A avaliação da massa fresca da raiz (MFR) foi realizada após seis meses e para isto, as raízes foram cortadas da parte aérea na região do colo, lavadas e pesadas. Logo após, o solo de cada unidade experimental foi homogeneizado para coleta de uma amostra de 500 cm^3 de solo. Uma subamostra de 250 cm^3 foi processada (JENKINS, 1964) para extração dos nematoides do solo e determinou-se o número de *M. xenoplax*/ 250 cm^3 de solo, sob microscópio estereoscópico, o que correspondeu a população final (PF), usada para estimar o fator de reprodução ($\text{FR} = \text{população final} / \text{população inicial}$) do nematoide (OOSTENBRINK, 1966). Também foi estimada a população final de nematoides de vida livre (PFTVL) no solo. Os valores de TCPA, MFR, FR e PFVL transformados em $\sqrt{x+1}$ foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$) utilizando-se o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

3.2.8 Efeito nematicida de isolados bacterianos sobre *M. xenoplax* em plantas de cravina

Com a intenção de testar o efeito nematicida das bactérias direto sobre o nematoide anelado, plantas de cravina foram utilizadas devido a sua suscetibilidade ao nematoide e a facilidade de produção de mudas e rápido desenvolvimento da planta.

Foram utilizadas as 15 bactérias testadas no biocontrole de *M. xenoplax* em pessegueiro conforme o item 3.2.7, cujas suspensões foram preparadas da mesma forma ($A_{540}=0,5$; 0,85% solução salina).

Para cada tratamento (vasos plásticos de 800 mL) 600cm^3 de solo infestados com aproximadamente 500 *M. xenoplax*, foram adicionados de 150 mL de suspensão bacteriana, mantendo-se uma umidade próxima a 60% da capacidade de campo. Em seguida, cada unidade experimental foi vedada com filme plástico e mantidas por 24 horas em casa de vegetação a $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ (Fig. 8A). As testemunhas consistiram de um tratamento com solo infestado com o nematoide e outra com solo esterilizado, adicionando-se a ambas 150 mL de água corrente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e constou de seis repetições para cada tratamento.

Após 24h, em cada unidade experimental foi transplantada uma muda de cravina (Fig. 8B) com 35 dias de idade e as plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação regular, a temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, por um período de 90 dias.

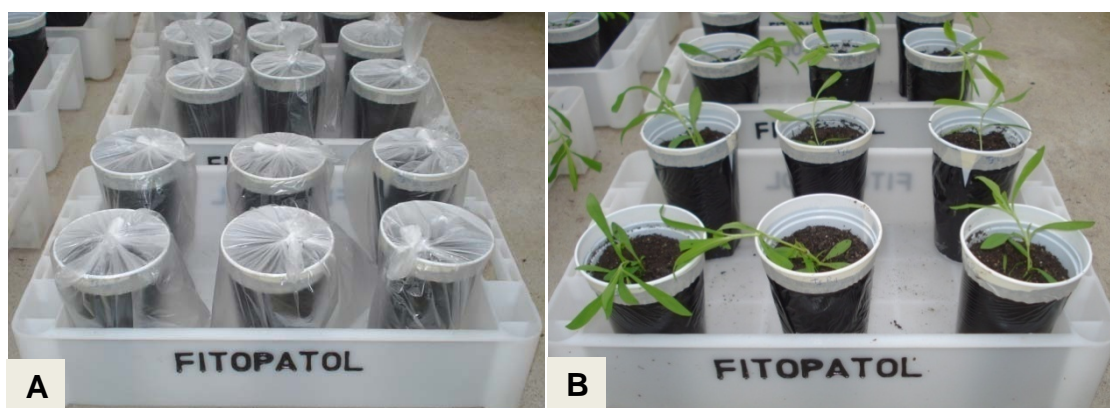


Figura 8 – Implantação do ensaio nematicida das bactérias sobre *M. xenoplax* em plantas de cravina: A) Câmara úmida em cada uma das unidades experimentais após a irrigação do solo com a suspensão bacteriana; B) Tratamentos após o plantio de uma muda de cravina por copo.

Determinou-se a massa fresca da parte aérea (MFPA) e o número de brotações por planta (NB). Para determinar a população final de *M. xenoplax* (PFT) e de nematoides de vida livre no solo (PFTVL), o solo de cada vaso foi homogeneizado e subamostras de 250cm^3 de solo foram coletadas e processadas de acordo com a

metodologia de Jenkins (1964). Os valores de TCPA, MFPA, NB, PFTVL e PFT, transformados em $\sqrt{x+1}$, foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$) utilizando-se o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

3.3 Resultados

Dentre os 99 isolados bacterianos testados, 83 apresentaram algum efeito nematicida *in vitro* sobre *M. xenoplax*, diferindo da testemunha ($P < 0,05$). A percentagem de mortalidade de nematoides, dos tratamentos que diferiram da testemunha, variou de 28,7 a 100% (tab. 4) e entre estes, 36 isolados apresentaram índices de mortalidade acima de 95% (96,74 – 100) (tab. 5). Estes foram selecionados para avaliação de seu potencial na inibição da eclosão de juvenis do nematoide anelado.

Quando avaliado o efeito dos isolados bacterianos sobre a eclosão de juvenis de *M. xenoplax*, verificou-se que a mesma foi reduzida por 33 dos 36 isolados testados quando comparados com a testemunha imersa somente em solução salina (tab. 6). Os índices de inibição de eclosão causados por estes isolados variaram entre 18 e 87%, onde os maiores percentuais inibitórios foram obtidos com as bactérias DFs2247, DFs1341 e DFs1983 (87%, 82% e 79 % respectivamente), (tab.7).

A partir dos resultados *in vitro*, 15 bactérias foram selecionadas para avaliação de seu potencial no biocontrole de *M. xenoplax* em pessegueiro 'GxN-9' bem como a capacidade de colonização de raízes de plântulas do referido porta-enxerto; e seu efeito nematicida em solo infestado com *M. xenoplax* cultivado com cravina.

Tabela 4 – Percentual de mortalidade de *Mesocriconema xenoplax* devido a ação de 99 isolados bacterianos após 24h de incubação a 25°C.

Tratamentos bacterianos	Mortalidade (%)	Tratamentos bacterianos	Mortalidade (%)	Tratamentos bacterianos	Mortalidade (%)
DFs0023	78,33c**	DFs1909	69,88e	DFs2109	100,00a
DFs0032	81,68c	DFs1923	22,55i	DFs2110	96,74a
DFs0066	100,00a	DFs1928	98,04a	DFs2113	81,03c
DFs0081	55,67f	DFs1932	37,29h	DFs2121	58,73f
DFs0185	69,46e	DFs1934	28,37h	DFs2122	85,42b
DFs0223	74,54d	DFs1935	19,46i	DFs2123	55,68f
DFs0306	100,00a	DFs1939	4,08j	DFs2124	100,00a
DFs0377	59,51f	DFs1941	82,07c	DFs2126	100,00a
DFs0390	100,00a	DFs1947	100,00a	DFs2133	100,00a
DFs0418	79,02c	DFs1949	100,00a	DFs2136	83,94c
DFs0419	80,64c	DFs1950	13,92i	DFs2137	19,25i
DFs0422	7,09j	DFs1955	45,71g	DFs2147	100,00a
DFs0439	97,95 ^a	DFs1958	83,90c	DFs2148	82,55c
DFs0582	46,87g	DFs1963	100,00a	DFs2155	54,17f
DFs0695	100,00a	DFs1967	17,77i	DFs2156	100,00a
DFs0706	22,57i	DFs1970	40,91g	DFs2162	22,33i
DFs0756	69,56e	DFs1983	100,00a	DFs2168	77,11d
DFs0886	100,00a	DFs1985	31,56h	DFs2172	50,00g
DFs1021	49,08g	DFs1986	100,00a	DFs2175	82,89c
DFs1039	86,87b	DFs1998	100,00a	DFs2180	6,01j
DFs1219	72,15d	DFs2007	100,00a	DFs2191	90,23b
DFs1256	100,00a	DFs2008	100,00a	DFs2193	37,08h
DFs1258	100,00a	DFs2027	68,60e	DFs2227	100,00a
DFs1320	12,65j	DFs2048	16,11i	DFs2229	100,00a
DFs1341	100,00a	DFs2049	100,00a	DFs2236	100,00a
DFs1344	9,38j	DFs2051	9,17j	DFs2239	100,00a
DFs1391	100,00a	DFs2052	65,06e	DFs2246	62,75e
DFs1421	29,63h	DFs2053	23,69i	DFs2247	100,00a
DFs1486	100,00a	DFs2060	74,54d	DFs2250	90,77b
DFs1650	76,06d	DFs2062	13,29j	DFs2251	100,00a
DFs1691	71,94d	DFs2089	64,12e	DFs2265	67,09e
DFs1887	93,15b	DFs2091	62,28e	Testemunha	16,08i
DFs1899	91,92b	DFs2099	100,00a		
DFs1902	69,61e	DFs2108	100,00a		
CV (%)	10,02				

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade.

** valores originais transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$.

Tabela 5 – Número de isolados bacterianos biocontroladores em função do agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott, quanto ao percentual de mortalidade de *Mesocriconeuma xenoplax* após incubação a 25°C por 24 horas.

Agrupamento das médias	Mortalidade (%)	Número de Isolados
a	96,74 – 100	36
b	85,42 – 93,15	6
c	78,33 – 83,94	10
d	71,94 – 77,11	6
e	62,28 – 69,88	10
f	54,17 – 59,51	5
g	40,91 – 50	5
h	28,37 – 37,29	5
i	13,92 – 23,69	9
j	4,08 – 13,29	7

Tabela 6 - Percentagem de inibição da eclosão de juvenis de *Mesocriconea xenoplax* submetidos à ação de 36 isolados bacterianos por 12 dias de incubação a 25°C.

Tratamentos	Inibição (%)*	Tratamentos	Inibição (%)*
DFs0066	49,90 e**	DFs2008	52,78 d
DFs0306	51,95 d	DFs2049	73,59 b
DFs0390	10,62 h	DFs2099	38,10 e
DFs0439	46,82 e	DFs2108	40,72 e
DFs0695	24,85 g	DFs2109	39,36 e
DFs0886	53,80 d	DFs2110	18,89 g
DFs1256	61,09 c	DFs2124	54,98 d
DFs1258	30,48 f	DFs2126	72,41 b
DFs1341	82,51 a	DFs2133	26,50 g
DFs1391	53,90 d	DFs2147	44,61 e
DFs1486	30,16 f	DFs2156	51,34 d
DFs1928	9,33 h	DFs2227	17,61 h
DFs1947	21,94 g	DFs2229	61,89 c
DFs1949	21,91 g	DFs2236	34,44 f
DFs1963	61,33 c	DFs2239	51,34 d
DFs1983	78,92 a	DFs2247	87,08 a
DFs1986	52,65 d	DFs2251	20,46 g
DFs1998	46,20 e	Testemunha	910 h
DFs2007	39,44 e		
CV (%)	13,45		

* valores originais transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$

**Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 7 - Número de isolados bacterianos biocontroladores em função do agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott, quanto ao percentual de inibição da eclosão de *Mesocriconea xenoplax* após incubação a 25°C por 12 dias.

Agrupamento	% de eclosão	Número de Isolados
a	78,92 – 87,08	3
b	72,41 – 78,91	2
c	61,09– 72,40	3
d	51,34 – 61,08	8
e	38,10 – 51,33	8
f	30,16 – 38,09	3
g	18,89 – 30,15	6
h	0,00 – 18,88	3

Entre os 15 isolados bacterianos avaliadas quanto à capacidade de colonização das raízes de pessegueiro 'GxN-9' *in vitro* (tab. 8), nove colonizaram o sistema radicular das plântulas (Fig. 9), sendo que dentre eles, oito colonizaram totalmente as raízes e apenas o isolado Dfs1341 colonizou de 1/3 a 2/3 do sistema radicular. Pelo método de visualização utilizado não foi verificada colonização radicular pelos outros seis isolados bacterianos.

Em relação aos dois substratos com diferentes gelificantes utilizados para a visualização da colonização radicular pelas bactérias, foi possível observar colonização radicular pelas bactérias em ambos. No entanto, o meio contendo ágar como agente gelificante apresentou maior turbidez, prejudicando a visualização da colonização, enquanto o substrato com Gelrite® permitiu maior transparência e com isto, melhor visualização da colonização. (Fig. 9).

Tabela 8 - Incidência e intensidade de colonização radicular por bactérias em plântulas de pessegueiro 'GxN-9' cultivados *in vitro* e avaliados sete dias após a microbiolização com isolados bacterianos.

Tratamentos	Incidência (%)	Intensidade*
DFs0306	100	3
DFs0886	0	0
DFs1256	0	0
DFs1341	100	2
DFs1391	100	3
DFs1963	100	3
DFs1983	100	3
DFs1986	100	3
DFs2008	100	3
DFs2049	100	3
DFs2124	0	0
DFs2126	0	0
DFs2229	0	0
DFs2239	100	3
DFs2247	0	0

*Escala de Habe; Uesugi, onde: 0 = nenhuma colonização, 1 = colonização até 1/3 das raízes, 2 = colonização de 1/3 até 2/3 das raízes e 3 = colonização de 2/3 até a totalidade das raízes, 3/3

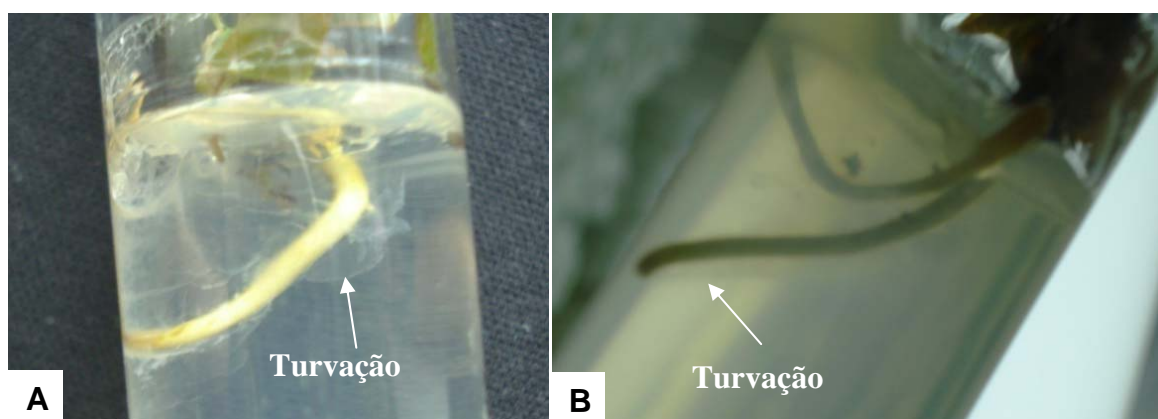


Figura 9 - Colonização radicular de plântulas de pessegueiro 'GxN-9' microbiolizadas com bactérias: A) meio Gelrite®-água (0,7%) e isolado bacteriano DFs2008; B) meio ágar-água (0,4%) e isolado bacteriano DFs1986.

Avaliando-se o efeito antagônico das bactérias sobre o nematoide anelado em plantas de pessegueiro, observou-se que nenhum dos isolados bacterianos foi capaz de promover 100% de mortalidade do nematoide (tab. 9). Porém, nove isolados bacterianos reduziram significativamente a sua reprodução ($P < 0,05$, FR entre 17,31 a 29,03) destacando-se os isolados DFs0306, DFs0886, DFs1341, DFs2008, DFs2049, DFs2126, DFs2229, DFs 2239 e DFs2247 que resultaram na redução de até 66% em relação a testemunha com nematoide e sem tratamento bacteriano (FR=49,56). Em contrapartida, o isolado DFs1963 apresentou nesta análise um FR superior a testemunha. Este isolado na avaliação do PCRBPC, através de oito testes, apresentou reação somente à solubilização de fosfato (Apêndice 2). Nos demais tratamentos o FR não diferiu da testemunha com nematoide.

Outros nematoides presentes nas amostras e a população de nematoides de vida livre (PFTVL) foram identificados, por meio da Chave de Diagnóstico Interativo de Nematoides Parasitas de Plantas, Vida Livre e Predadores (UNL NEMATOLOGY LAB, 2012) e encontrados nematoides de vida livre dos gêneros *Achromodora* sp., *Cephalobus* sp., *Dorylaimus* sp. e *Mononchus* sp, que não apresentavam estilete e os fitoparasitas *Aphelenchoides* sp. e *Aphelenchus* sp.

Dentre os isolados bacterianos, 13 não influenciaram na variação populacional total dos nematoides de vida livre (PFTVL) em relação as testemunha inoculada ou não inoculada com *M. xenoplax*. O tratamento com o isolado DFs0886 apresentou PFTVL inferior a testemunha inoculada e não inoculada com o nematoide anelado. Porém, nos tratamento do solo com os isolados DFs1963, DFs1256 e DFs2124 verificou-se aumento significativo do número de nematoides de vida livre (PFTVL = 763; 653 e 602 nematoides, respectivamente) em relação às duas testemunhas (sem nematoide 269 e com nematoide 377 nematoides), (tab. 9).

Em relação às variáveis relacionadas ao desenvolvimento do pessegueiro (tab. 9), não houve diferença significativa entre os tratamentos para a taxa de crescimento da parte aérea (TCPA), demonstrando que nenhuma das bactérias inoculadas incrementou o crescimento do porta-enxerto 'GxN-9', na presença do nematoide. Considerando-se os valores de massa fresca da raiz (MFR), verificou-se que os tratamentos com os isolados DFs2049 e DFs0886, proporcionaram aumento significativo dessa variável.

Tabela 9 – Avaliação da taxa de crescimento da parte aérea (TCPA) determinada seis meses após a deposição do nematoide *Mesocriconema xenoplax*, massa fresca da raiz (MFR), fator de reprodução de *M. xenoplax* (FR), população final de nematoides de vida livre (PFTVL) em mudas de porta-enxerto de pessegueiros 'GxN-9' mantidas em casa de vegetação e submetidas a aplicação de diferentes isolados bacterianos e avaliadas oito meses após a deposição de *M. xenoplax*.

Tratamentos	FR	PFTVL	MFR (g)	TCPA (cm)
DFs0306	24,98 fg*	362,44 def	162,89 d**	2,64 ^{ns}
DFs0886	17,31 g	172,67 f	218,37 a	2,72
DFs1256	52,49 ab	653,33 ab	209,93 ab	2,59
DFs1341	24,02 fg	301,78 ef	200,63 abc	2,58
DFs1391	41,73 bcd	462,00 bcde	208,46 ab	2,37
DFs1963	60,65 a	763,68 a	164,91 cd	3,08
DFs1983	37,76 cde	544,44 bcd	210,74 ab	2,09
DFs1986	42,61 bcd	447,48 bcde	167,75 cd	2,53
DFs2008	34,33 def	437,11 cde	191,66 abcd	2,55
DFs2049	28,90 efg	252,00 ef	223,45 a	2,93
DFs2124	43,30 bcd	602,00 abc	158,13 d	2,65
DFs2126	35,21 def	267,56 ef	170,29 cd	2,69
DFs2229	33,40 def	301,78 ef	180,37 bcd	2,41
DFs2239	26,50 efg	286,22 ef	176,26 bcd	3,3
DFs2247	29,03 efg	466,67 bcde	161,91 d	2,73
***T CN	49,56 bc	377,48 def	180,60 bcd	2,86
****T SN		269,11 ef	209,94 ab	2,29
CV (%)	23,83*	18,83*	14,58*	44,34*

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

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

***T CN: testemunha com nematoide

****T SN: testemunha sem nematoide

Através da análise conjunta dos testes (tab. 10), observa-se a relação positiva entre a intensidade de PCRBPC e o controle de *M. xenoplax in vitro*, em que um expressivo número de isolados demonstrou potencial biocontrolador quando avaliada à mortalidade do nematoide *in vitro*, (tab. 10). No entanto, observações no desempenho dos isolados sobre a eclosão, mostram que alguns destes que apresentaram reação quitinolítica positiva (DFs1391, DFs1986 e DFs2114, Apêndice 2) não apresentaram maiores índices de inibição de eclosão *in vitro* do que os isolados que foram quitinases negativos.

A análise do PCRBPC relacionado com o FR (tab. 10) demonstra que não se pode atribuir a um único fator a redução do FR dos nematoides e possivelmente outros mecanismos não estudados podem estar atuando.

Tabela 10 – Relação entre o potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento (PCRBPC) e o total de isolados selecionados (TIU) com a mortalidade, eclosão e fator de reprodução (FR) de *Mesocriconeuma xenoplax* em pessegueiro menor do que a testemunha.

PCRBPC	TIU	Mortalidade > 95%	Inibição Eclosão > 50%	FR < Test*
8	3	3	2	0
7	32	15	6	4
6	23	7	3	2
5	29	7	1	1
4	5	1	1	1
3	1	0	0	0
2	2	1	1	1
1	4	2	1	0
Total	99	36	15	09

* Fator de Reprodução < Testemunha

No solo com cultivo de plantas de cravina, verificou-se redução significativa da população de *M. xenoplax* em todos os tratamentos (28,36-100%) em relação à testemunha, sendo os maiores valores de supressão obtidos com as bactérias DFs0886, DFs1256, DFs1391, DFs2008, DFs2049, (tab. 11).

Em relação ao efeito dos tratamentos sobre os nematoides de vida livre presentes no solo, os isolados DFs2126 e DFs2239 não afetaram estas populações comparativamente com a testemunha ($P>0,05$); porém, com os demais isolados bacterianos, houve uma redução de 40 a 95,6% nas populações destes nematoides (tab. 11).

Para a variável massa fresca da parte aérea, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com as bactérias e a testemunha. Resultado semelhante obtido para número de brotações (tab. 11).

As plantas do controle com o nematoide anelado apresentaram raízes menores, enquanto as plantas cultivadas na ausência de nematoide apresentaram raízes visivelmente maiores e vigorosas, o que confirma cravina como planta indicadora do potencial de dano provocado pelo nematoide anelado no sistema radicular.

Tabela 11 - População final de *Mesocriconea xenoplax* (PFT), população final total de nematoides de vida livre (PFVL), massa fresca da parte aérea (MFTPA) e número de brotações (NB) em plantas de *Dianthus barbatus*, originadas de sementes e com solo infestado com *M. xenoplax* e inoculado com bactérias, em condições de casa de vegetação e avaliadas aos 90 dias após o plantio

Tratamentos	PFT	PFTVL	MFTPA	NB
			(g)	
DFs0306	102,22 e*	204,11 cde**	7,61 ^{ns}	7,00 ^{ns}
DFs0886	0 g	52,18 ef	8,15	6,6
DFs1256	0 g	26,67 f	9,01	6,83
DFs1341	200,00 d	416,66 b	8,29	9,33
DFs1391	0 g	92,48 def	8,47	7,83
DFs1963	4,4 g	104,86 def	9,04	7,17
DFs1983	65,19 g	243,83 cd	8,26	6
DFs1986	41,48 fg	128,15 def	8,64	7,83
DFs2008	0 g	49,09 ef	9,57	7
DFs2049	0 g	62,22 ef	8,57	6
DFs2124	248,89 c	354,13 bc	8,05	8
DFs2126	423,70 b	447,17 ab	9,06	6,17
DFs2229	28,15 fg	191,44 def	8,49	6,5
DFs2239	272,59 c	441,78 ab	9,56	7
DFs2247	51,85 f	164,94 def	8,53	7,83
*Test CN	622,22 a	591,46 a	8,28	7,83
CV (%)	19,76**	37,29**	18,13**	26,11**

*Médias seguidas das mesmas letras, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade;

** valores originais transformados para $\sqrt{x+1}$

ns = não significativo;

*** T CN: testemunha com nematoide.

A relação entre PCRBPC enzimático com redução populacional do nematoide em mudas de pessegueiro e de cravina está sumarizada na tab. 12, podendo ser observado que o comportamento dos isolados sobre o nematoide anelado pode ter variado em função do hospedeiro utilizado ou mesmo, devido à metodologia de aplicação dos isolados bacterianos no solo.

Nesta correlação (tab. 12) destaca-se o isolado DFs0886 que mostrou melhor desempenho de controle do nematoide em ambos os hospedeiros, bem como o contraste apresentado pelo isolado DFs1963, promovendo o FR superior a testemunha em mudas de 'GxN-9' e em mudas de cravina reduziu significativamente a população de nematoides em relação a testemunha.

Tabela 12 – Relação das 15 bactérias que apresentaram inibição de eclosão de ovos de *Mesocriconema xenoplax* > 50% e a sua reação a cada um dos testes do potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento; colonização *in vitro* das raízes de explantes de pessegueiro 'GxN-9' (CR); fator de reprodução (FR) de *M. xenoplax* em mudas de 'GxN-9'; e, população final total (PFT) de *M. xenoplax* em cravina.

*TRAT	*AM	*AMO	*ANT	*FOS	*GEL	*LIT	*QUI	*TW	*CR	*FR	*PFT
DFs0306	+	+	-	+	+	-	-	-	+	24,98 fg	102,22 e
DFs0886	+	+	+	+	+	+	-	+	-	17,31 g	0 g
DFs1256	+	+	+	+	+	+	-	+	-	52,49 ab	0 g
DFs1341	+	+	+	+	+	+	-	+	+	24,02 fg	200,00 d
DFs1391	+	+	+	+	+	+	+	+	+	41,73 bcd	0 g
DFs1963	-	-	-	+	-	-	-	-	+	60,65 a	4,4 g
DFs1983	+	+	+	+	+	-	-	+	+	37,76 cde	65,19 g
DFs1986	+	+	+	+	+	+	+	+	+	42,61 bcd	41,48 fg
DFs2008	+	+	+	+	+	-	-	-	+	34,33 def	0 g
DFs2049	+	+	+	+	+	+	-	+	+	28,90 efg	0 g
DFs2124	+	+	+	+	+	-	+	+	-	43,30 bcd	248,89 c
DFs2126	+	+	+	+	+	-	-	+	-	35,21 def	423,70 b
DFs2229	+	+	+	+	+	-	-	+	-	33,40 def	28,15 fg
DFs2239	-	-	-	+	+	-	-	-	+	26,50 efg	272,59 c
DFs2247	+	+	+	+	+	+	-	+	-	29,03 efg	51,85 f
**Test.										49,56 bc	622,22 a

*TRAT = tratamentos; AM = amido; AMO = amônia; ANT = antibiose; FOS = fosfatase; GEL = gelatina; LIT = Litmus®; QUI = quitina; TW = tween;

**Test = testemunha

3.4 Discussão

Uma etapa fundamental na escolha de um agente de controle biológico, após o isolamento, é a sua seleção, a qual permite reduzir o número de candidatos (BARRA et al., 2008) tornando viável a realização de testes com plantas *in vivo*. A utilização dos testes como critério de seleção de antagonistas de *M. xenoplax* se mostrou efetivo, proporcionando uma redução de 99 para 15 isolados para avaliação *in vivo*. De acordo com Lucon; Melo (1999) ainda que os testes de antagonismo *in vitro* nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo*, o seu uso, facilita uma primeira seleção, já que freqüentemente se trabalha com um grande número de isolados.

Entre os mecanismos pelos quais as bactérias podem causar a mortalidade ou inibir a eclosão de nematoides, estão à produção de enzimas líticas, como as proteases (PARK et al., 2004), as quitinases (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; CRONIN et al., 1997; PARK et al., 2004), as lipases (AALTEN et al., 1998) dentre outras. Isolados que apresentem degradação de quitina são relatados como promissores na inibição de eclosão de ovos de nematoides, porém alguns isolados quitinolíticos demonstraram baixo potencial de inibição da eclosão de ovos de *M. xenoplax*, contrariando as pesquisas de Zhang; Yuen et al. (2000) que apontam a quitinase como uma das principais responsáveis por alterações na eclosão de nematoides. O que também foi verificado por Cronin et al (1997), que avaliando o potencial de dois isolados bacterianos produtores de quitinase sobre a eclosão de J2 de *Globodera rostochiensis*, constataram que estes isolados inibiram a eclosão em até 90% quando comparados com a testemunha. No entanto, estes autores afirmaram que a produção de quitinase não deve ser o único fator envolvido na habilidade destas bactérias em inibir a eclosão deste nematoide.

Westcott; Kluepfel (1993) observaram mortalidade de até 100% de *M. xenoplax* e redução na eclosão de ovos na presença de *Pseudomonas aureofaciens* BG33. Segundo estes autores, a ação nematocida estaria relacionada à produção de compostos tóxicos pela bactéria. O que explicaria alguns resultados obtidos e a possível produção de outros compostos por parte dos isolados bacterianos estudados neste trabalho. Biocontrole por bactérias também foi observado em *Meloidogyne* sp. (KHAN et al., 1997; NAVES, 2004; DAWAR et al., 2008); *M. exigua* (OLIVEIRA et al., 2007); *Heterodera glycines* (ARAÚJO et al., 2002) entre outros.

Sabendo-se que a maior parte do ciclo de vida de *M. xenoplax* ocorre na superfície das raízes (KLUEPFEL; McINNIS; ZEHR, 1993), rizobactérias tornam-se bons candidatos ao controle biológico deste nematoide.

Métodos simples, para verificar se uma bactéria coloniza o sistema radicular, têm sido usados, como a microbiolização das sementes (ZEVALETA-MEJIA; VAN GUNDY, 1982; SILVA; ROMEIRO, 2004; SOTTERO et al., 2006) e a colonização de raízes (LOPES, 2011). Dependendo da espécie de planta em estudo, o método de microbiolização de semente permite a avaliação em um curto período de tempo de um grande número de isolados, porém, no caso de pessegueiro, em que a semente não é o melhor meio de obtenção do explante, o método de microbiolização das raízes dos explantes, obtidos por meio do estabelecimento de brotações, mostrou-se mais adequado.

Comparando os resultados da colonização radicular de explantes obtidos nesse estudo com os de Soterro et al. (2006), verifica-se que a metodologia utilizada possibilitou êxito, porém, com as limitações do estabelecimento *in vitro* de pessegueiro devido às contaminações e lenta taxa de multiplicação dos explantes, o que acarretou limitado número de explantes para o teste de colonização. Deste modo, apenas 15 isolados bacterianos foram avaliados foram microbiolizados, dentre os quais, 53 % colonizaram o sistema radicular. Esta percentagem de isolados colonizadores é considerada alta quando comparada aos resultados de Soterro et al. (2006), que ao testarem a colonização de 64 bactérias em alface, verificaram que apenas oito isolados colonizaram, uma eficácia de 12,5% de seus isolados.

A colonização radicular *in vitro* pode ser usada como auxiliar na seleção de agentes de biocontrole, já que a rizosfera consiste no habitat para as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, as quais colonizam inúmeras espécies de plantas, podendo com esta interação desencadear mudanças fisiológicas, proporcionando benefícios como controle de fitopatógenos, o aumento da absorção de nutrientes, entre outros (SILVA; ROMEIRO, 2004; COELHO et al., 2007).

Porém, apesar de uma bactéria colonizar o sistema radicular de determinado genótipo, não significa que ela seja benéfica e promoverá controle sobre patógenos, pois segundo Schippers et al. (1987) a interação entre bactérias e raízes de plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra. A exemplo, a bactéria Dfs1963, que

apresentou efeito nematicida e nematostático e colonizou o sistema radicular de pessegueiro *in vitro*, porém na interação com a planta de pessegueiro em condições de casa de vegetação, o tratamento com a bactéria apresentou alta taxa de reprodução do nematoide. Enquanto que em tratamento aplicado diretamente sobre o solo infestado com nematoide, em plantas de cravina, promoveu controle de 100%. Neste caso, supõe-se, que poderá ter ocorrido algum efeito pré-plantio da bactéria sobre o nematoide ou mesmo a bactéria ter colonizado o sistema radicular de cravina e neste sistema atuar como biocontroladora. Sabendo que a bactéria DFs1963 foi isolada a partir do rizoplane de pessegueiro e colonizou o sistema radicular no teste de microbiolização, a interação deste isolado bacteriano com o pessegueiro poderá promover a liberação de compostos que beneficiem os nematoides.

Por outro lado, o isolado DFs0886, que não colonizou o sistema radicular do porta-enxerto 'GxN-9', resultou no melhor desempenho como biocontrolador de *M. xenoplax*, reduzindo em mais de 50% o FR do nematoide no pessegueiro, maior MFR e 100% de mortalidade em solo cultivado com cravina. Lopes (2011) também avaliando a colonização *in vitro* de raízes de mudas de bananeira "Prata-Anã" por 10 rizobactérias observou que nenhuma foi capaz de colonizar o sistema radicular, no entanto, testados sobre *Meloidogyne javanica*, quatro destes isolados proporcionaram mortalidade de J2 de acima de 95% e ainda incrementaram o desenvolvimento da parte aérea das plantas microbiolizadas. Demonstrando que apesar da ausência de colonização, as bactérias possuem potencial de controle por meio de mecanismos de ação diretos sobre o nematoide.

Neste trabalho, o diferente comportamento das bactérias sobre o controle do mesmo patógeno, pode ser atribuído as condições de inoculação e das espécies, pessegueiro e cravina, bem como ao tipo de exsudados radiculares produzidos, compostos tóxicos, condições de pH e temperatura, fatores que segundo Baker; Défago (1987) influenciam o desempenho dos microrganismos. Além disso, o controle de nematoides por bactérias pode ser alcançado pela competição por nutrientes e espaço (MELO; AZEVEDO, 1998; ROMEIRO, 1999; VAN LOON, 2007), produção de compostos voláteis nematicidas, produção de sideróforos (NEILANDS, 1995) podendo um destes mecanismos agir isoladamente ou ocorrer um efeito somatório dos mesmos (MELLO, 1998).

Considerando as melhores performances das bactérias nos testes avaliando-se o controle do nematoide anelado *in vivo* em cultivo com cravina, colonização radicular *in vitro* de plântulas do porta-enxerto 'GxN-9', pôde-se selecionar os melhores candidatos como biocontroladores do *M. xenoplax* para a cultura do pessegueiro, destacando-se os isolados DFs0306, DFs0886, DFs1341, DFs2008, DFs2049, DFs2229, DFs2239 e DFs2247. Muito embora tenha sido possível demonstrar a capacidade antagônica de todos esses isolados, apenas o isolado DFs0886 foi capaz de suprimir efetivamente, mais de 50% da reprodução do nematoide no porta-enxerto testado.

Dentre os isolados bacterianos com melhor desempenho no presente estudo, DFs0306 apresenta características de um potencial biocontrolador, por atuar sobre mais de um patossistema, tendo sido relacionado à redução dos sintomas provocados por *Rhizoctonia solani* e redução da reprodução de *Meloidogyne graminicola* em arroz (SOUZA JÚNIOR et al., 2010), redução dos sintomas provocados *Bipolaris oryzae* e *Gerlachia oryzae* e aumento da produção de enzimas relacionadas à patogênese em arroz (LUDWIG, 2009).

O espectro de ação, juntamente com a diversidade de mecanismos de biocontrole, são aspectos desejados em agentes de biocontrole. A promoção de crescimento esta incluída entre um dos benefícios das rizobactérias às plantas com as quais elas interagem e inúmeros trabalhos relatam a sua ocorrência (AHMAD et al., 2008; ROMEIRO, 2007). O benefício de rizobactérias sobre o crescimento de plantas, intensamente observado em plantas anuais, também tem sido observado em plantas perenes, como cafeeiro (FREITAS, 1989), plantas cítricas (FREITAS; VILDOSO, 2004) e abeto (CHANWAY et al., 2000).

Considerando-se que *M. xenoplax* provoca danos no sistema radicular de pessegueiro, como necroses e redução da quantidade e volume das raízes; redução da altura das plantas, do diâmetro do tronco, da matéria fresca da planta inteira e do número de frutos produzidos (LOWNSBERY et al., 1977; NYCZEPIR et al., 1988), é desejável que biocontroladores de patógenos radiculares em pessegueiro também possuam o atributo de promotores do crescimento das plantas. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, dois isolados, DFs0886 e DFs2049, promoveram o aumento de MFR das mudas de pessegueiro em comparação com a testemunha com nematoide. Este aumento de MFR pode estar relacionado à atenuação dos

danos pela diminuição da população de nematoide ou por meio da aquisição de resistência sistêmica induzida (ROMEIRO; GARCIA, 2003).

A redução da população do nematoide anelado proporcionada pela ação de rizobactérias também foi observada por outros autores. Kluepfel et al., (1993) isolaram bactérias da rizosfera de pessegueiro em solo supressivo a *M. xenoplax*. Dentre os 290 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes isolados, 2,4% deles suprimiram o nematoide em mudas de pessegueiro tratadas. McINNIS et al. (1990) também observaram a redução da população de *M. xenoplax*, quando as raízes de pessegueiro foram imersas antes do plantio em suspensão do isolado de *Pseudomonas aureofasciens*, obtido da rizosfera de árvores de pêssego em solo supressivo à *M. xenoplax*. Kluepfel et al. (2004) uniram o potencial biocontrolador de *Pseudomonas* sp. BG33R ao processo de solarização e observaram significativa redução da população de *M. xenoplax* em testes a campo.

O isolamento e aplicação de bactérias biocontroladoras tem sido demonstrado em uma série de patossistemas e comportamentos distintos ser observados. Fabry et al., (2007) isolaram bactérias biocontroladoras a partir de solo rizosférico e raízes de plantas antagonistas a *Meloidogyne javanica* e utilizaram em combinação com tratamentos térmicos do solo e observaram uma redução significativa desta população no solo.

Enquanto, Souza Júnior et al. (2010) analisaram a compatibilidade entre rizobactérias e o efeito de suas combinações sobre a queima-das-bainhas (*Rhizoctonia solani*), meloidoginose (*Meloidogyne graminicola*) e a promoção de crescimento de plantas de arroz e observaram o controle dos patógenos por parte de cinco combinações de bactérias e DFs306 isoladamente, porém houve pequeno ou nenhum aumento de algumas variáveis de crescimento, ou ainda, valores inferiores aos proporcionados pela testemunha. O que segundo Stadnik; Buchenauer (1999) pode ser explicado pelo possível deslocamento de energia para a proteção da planta contra o patógeno.

Em relação à população de nematoides de vida livre observada no experimento com 'GxN-9', a variação não foi significativa em relação a testemunha. Porém, nos tratamentos com cultivo de cravina, onde os índices de supressão do nematoide chegaram a 100%, em cinco tratamentos, foi verificada a presença de

nematoides de vida livre (de 26,67 a 92,48 nematoides/600cm³ solo). O que indica que alguns dos tratamentos bacterianos, DFs0886, DFs1256, DFs1391, DFs2008 e DFs2049, possam ter afetado diretamente o nematoide anelado e não os de vida livre permitindo que nematoides não patogênicos sobrevivam e interajam no complexo radicular da planta, o que faz destes isolados promissores candidatos no controle biológico do nematoide anelado.

De acordo com Goulart (2007) os estudos com nematoides no Brasil ainda se limitam aos nematoides fitoparasitas, havendo a necessidade de incluir nos estudos aqueles de vida livre, pois entre outras características que lhes confere importância está o fato de serem bacteriófagos e micófitos, participarem da degradação de matéria orgânica (WHITFORD et al., 1982), bem como na regulação da população microbiana do solo. Além disso, a dinâmica populacional de nematoides microbífagos tendem a se sincronizar com aquelas dos microrganismos dos quais esses nematoides se alimentam (MIKOLA, 1998) e podem ainda, acelerar o crescimento microbiano por meio da movimentação alimentar que realizam (NILES, FRECKMAN, 1998).

De modo geral, os resultados apresentados neste trabalho mostram que os tratamentos com rizobactérias podem reduzir a população do nematoide e desta forma, possuem potencial como agente de controle de *M. xenoplax* em pessegueiro. A aplicação de bactérias biocontroladoras associadas a outras medidas, como a solarização do solo (KLUEPFEL et al., 2002), tem se mostrado promissoras na redução da população de *M. xenoplax*. Estudos neste sentido podem ser conduzidos para melhor avaliar o potencial biocontrolador das bactérias que reduziram a população de *M. xenoplax*, conjuntamente com outras medidas; pela utilização de combinações de bactérias, bem como pelo uso de outros porta-enxerto de pessegueiro, pois para o sucesso de um biocontrolador sobre um patógeno, todas as medidas de manejo disponíveis devem ser adotadas.

3.5 Conclusões

A seleção de isolados bacterianos potenciais ao controle biológico de *M. xenoplax* em pessegueiro é eficiente quando utilizados testes para avaliar o potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção de crescimento (PCRBPC) juntamente com os testes de mortalidade e inibição de eclosão *in vitro*, permitindo a redução do número de candidatos para avaliação *in vivo*.

Bactérias de diferentes habitats promovem a redução populacional de *M. xenoplax* em pessegueiro;

Isolados bacterianos aplicados em solo sob cultivo do porta-enxerto de 'GxN-9' possuem efeito diferenciado sobre a população de *M. xenoplax* do que quando aplicados em solo sob cultivo de cravina.

4 Conclusões

Isolados bacterianos possuem potencial de produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ ou promoção de crescimento (PCRBPC) em distintos nichos ecológicos, sendo que alguns destes nichos abrigam isolados com maior potencial de produção para determinados compostos;

Os testes *in vitro* auxiliam na redução e escolha de potenciais candidatos ao controle biológico de patógenos, no entanto o máximo de eficiência *in vitro* não é sinônimo da mesma eficiência *in vivo*;

Determinadas bactérias reduzem a população de *M. xenoplax* e sua eficiência demonstra estar relacionada com a interação do agente biocontrolador com o hospedeiro ao qual o patógeno este associado.

5 Referências

- AALTEN, P.M.; VITOUR, D.; BLANVILLAIN, S.R.; GOWEN, S.R.; SUTRA, L. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.357-361, 1998.
- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. **Produção brasileira de pêssego**. São Paulo: FNP, p.404-409, 2011.
- AGROFIT. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit.cons/principal>. Acessado em 13 mar. 2012.
- AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions - strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008, p.41-54.
- ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.
- ARAÚJO, F.F., J.F.V SILVA & A.S.F. ARAÚJO. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.197-202, 2002.
- ARDUIM, G.S. **Utilização e caracterização biológica de rizobactérias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira**. 2006. 65f. Tese de mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.
- 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.; ZAVALITA-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.
- BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E.M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium* wilt. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1128-1137, 2000.

- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 2009. 341p
- BHARATHI, R.; VIVEKANANTHAN, R.; HARISH, S.; RAMANATHAN, A.; SAMIYAPPAN, R. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. **Crop Protection**, v.23, p.835–843, 2004.
- BOWEN, G.D.; FOSTER, R.C. Dynamics of microbial colonization of plant roots. In: BROUGHTON, W.J.; JOHN, C.J. **Symposium of Soil Microbiology and Plant Nutrition**. University of Malaya Press, Kuala Lumpur, p.14-31, 1978.
- 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.285-327, 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 Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnicas de eletroforese usadas no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, vol.25, n.1, p.35-44, 2001.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; CAMPOS, A.D.; PEREIRA, J.F.M.; RASEIRA, M.C.B. Avaliação de porta-enxertos de *Prunus* quanto à suscetibilidade ao nematoide anelado e ao conteúdo de enzimas fenol oxidases. **Nematologia Brasileira**, v.22, n.1, p.32-38, 1998.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; FORTES, J.; ALMEIDA, M.R.A.A. Associação de *Criconemella xenoplax* com a morte precoce do pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 122-131, 1993.
- CARNEIRO, R.M.G.; CAMPOS, A.D.; FINARDI, N.L.; FORTES, J.F. Nematoides: ocorrência e dano. In: **A cultura do pessegueiro**, p. 280-295, 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.
- CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.
- 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, Y.; MEJ, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: 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.
- CHO, J. C.; TIEDJI, J. M. Biogeography and degree of endemcity of Fluorescent pseudomonas strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5446–5448, 2000.
- COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, B. G. M. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp.

com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1413-1420, 2007.

CRONIN, D., MOENNE-LOCCOZ, Y., FENTON, A., DUNNE, C., DOWLING, D. N., AND O'GARA, F. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonas* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1357–1361, 1997.

DAWAR, S., M. TARIQ AND M.J. ZAKI. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal Botany**, v.40, n.1, p.439-444. 2008.

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

DUFFY, B., SCHOUTEN, A., AND RAAIJAMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.501- 538, 2003.

DUNNE, C., MOENNE-LOCCOZ, Y., DE BRUIJN, F., OGARA, F., Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. **Microbiology**, v.146, 2069–2078. 2000.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Sistemas de Produção**, 4. ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica. Nov. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessegueiro/CultivadoPessegueiro/autores.htm>.

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

FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; COUTINHO, M.M.; TÓTOLA, M.R.; OLIVEIRA, J.R.; DALLEMO-LEGIARETTA, R.; FERRAZ, S. Obtenção de bactérias para 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, p.079-082. 2007.

FACHINELLO, J. C.; SILVA, C.A.P.; SPERANDIO, C.; RODRIGUES, A.C.; STRELOW, E.Z. Resistência de porta-enxertos para pessegueiro e ameixeira aos nematoides causadores de galhas (*Meloidogyne* spp.). **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.69-72, 2000.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S.; SCHMITZ, J.D.; BETEMPS, D.L. **Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil**. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.E, p.109-120, 2011.

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

FAO - Food and agriculture organization of the united nations. **Peaches and Nectarines Production**. Statistical Databases. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 15 mar. 2012.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.5, p.871-879, 2005.

FORTES, J.F.; MARTINS, O.M. Sintomatologia e controle das principais doenças. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.do C.B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Pelotas: Embrapa CNPACT, p.243-264, 1998.

FOSTER, R.C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. **Annual Review Phytopathology**, v.24, p.211-234, 1986.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, v.13, p.31-34, 1989.

FREITAS, S.S.; AGUILAR VILDOSO, C.I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

GARCIA, J.A.L.; DOMENECH, J.; SANTAMARIA, C.; CAMACHO, M.; DAZA, A. MAÑERO, F.J.G. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: Relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. **Environmental Experimental Botany**, v.52, p.239-251, 2004.

GOMES, C.B.; CAMPOS, A.D. Nematoides. In: RASEIRA, M.C.B.; QUEZADA, A.C. (Ed.). **Pêssego: produção**. Brasília: Serviço de Produção de Informações, p.115-122, 2003.

GOMES, C.B.; CAMPOS, A.D.; ALMEIDA, M.R.A. Ocorrência de *Mesocriconema xenoplax* e *Meloidogyne javanica* associados à morte precoce de ameixeiras e à redução da atividade das enzimas fenoloxidasas. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba. v.24, n.2, p.249-252, 2000.

GOMES, C.B.; FERRARI, A.T.; SIGNORINI, C.B. e SOMAVILLA, L. Efeito nematicida in vitro de isolados bacterianos sobre *Criconemoides xenoplax*. **Summa Phytopathologica**, v. 38 (supplement), February 2012. XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Jaguariúna, 2012.

GOULART, A.M.C. **Diversidade de nematoides em agroecossistemas e ecossistemas**. Planaltina, DF. Embrapa, Cerrados. 2007. 71p.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, n.37, p.395 – 412, 2005.

GRIFITHS, B.S.; CAUL, S. Migration of bacterial-feeding nematodes, but not protozoa, to decomposing grass residues. **Biology and Fertility of Soils**. v.15, p.201–207. 1993.

HABE, M.H.; UESUGI, C.H. Método “in vitro” para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.4, p.657-660, 2000.

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.

HSU, S.C., LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium to enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, v.29, p.422–426, 1975.

IBGE. **Banco de dados**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>. Acesso em: 12 mar. 2012.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Produção Brasileira de Frutas 2009.**

Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acessado em mar 2012.

JENKINS, W.R.A Rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.48, n.9, p.692, 1964.

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

KHAN, T.A.; S.K., SAXENA. Integrated management of root knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. **Bioresource Technology**, v.61, n.3, p.247-250, 1997.

KISHORE, K.; PANDE, S.; PODILE, A.R. Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.) **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.260–268, 2005.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885–886, 1980.

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

KLOEPPER, J.W. Plant growth promotion rhizobacteria as biological control agents. In: F.B. Meeting Jr. (ed.). **Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management**. New York, p. 255-274, 1993.

KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A.; COLLINS, D.J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms. **Plant and Soil**, v.136, p.95-102, 1991.

KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A.; YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidyde 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.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1219-1232, 1992.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. ; ZHANG, S. Induziu resistência sistêmica e promoção do crescimento vegetal por *Bacillus* spp **Fitopatologia**, v.94, n.11, p.1259-66, 2004.

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.

- KLUEPFEL, D. A.; MCLNNIS, T. M.; ZEHR, E. I. Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Criconemella xenoplax*. **Phytopathology**, v.83, n.11, p.1240-1245, 1993.
- KLUEPFEL, D. A.; NYCZEPIR A. P.; LAWRENCE J. E.; WECHTER, W. P.; LEVERENTZ, B. Biological Control of the Phytoparasitic Nematode *Mesocriconema xenoplax* on Peach Trees. **Journal of Nematology**, v.34, n.2, p.120–123, 2002.
- LAZZARETTI, E.; MELO, I.S. **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 28. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 21p.
- LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.238-243, 2002.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- LOPES, P. S. **Aplicação de rizobactérias em explantes e plântulas de bananeira 'Prata-Anã' no controle de *Meloidogyne javanica* e no desenvolvimento de mudas**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação do Semiárido. Universidade Federal de Montes Claros, Janaúba. 2011.
- LOWNSBERY, B.F.; ENGLISH, H.; NOEL, G.R.; SCHICK, F.J. Influence of Nemaguard and Lovell rootstocks and *Macroposthonia xenoplax* on bacterial canker of peach. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.9, n.3, p.221-224, 1977.
- LUCON, C.M.M.; MELO, I.S. Seleção de rizobactérias antagonicas a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathology**, v. 25, p.132-136, 1999.
- LUDWIG, J. **Potencial de isolados bacterianos como biocontroladores de nematoides e fungos e como indutores de resistência em plantas de arroz**. 2009. 104f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MARIANO, R.; SILVEIRA, E.B. da. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2ªed. Recife. UFRP, 2005, 184p.
- MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Revision of Phytopatology**, v.42, p.35-59, 2004.
- McINNIS, T.; KLUEPFEL, D.; ZEHR, E. Suppression of *Criconemella xenoplax* on peach by rhizosphere bacteria. In: **Second International Nematology Congress**, Veldhoven. The Netherlands, Abstracts of Papers, v.106, 1990.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 222-228, 2002.
- MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, 1999. 308p.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. 264p.
- MIKOLA, J. HEIKKI S. No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. **Ecology**, v.79, p.153–164, 1998.

- MOJTAHEDI, H.; LOWNSBERY, B.F. Pathogenicity of *Criconeoides xenoplax* to prune and plum rootstocks. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.7, n.2, p.114-119, 1975.
- 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.
- NEILANDS, J. B. 1995. Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.: 26723-26726, 1995.
- NILES, R.K.; FRECKMAN, D.W. From the ground up: nematode ecology in bioassessment and ecosystem health. In: BARKER, K.P.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L. **Plant and Nematode Interactions**. American Society of Agronomy. Madison, EUA, p.65-85, 1998.
- NYCZEPIR, A. P.; SHAPIRO-LLAN, D. I.; LEWIS, E. E.; HANDOO, Z. A. Effect of Entomopathogenic Nematodes on *Mesocriconeuma xenoplax* Populations in Peach and Pecan. **Journal of Nematology**, v.36, n.2, p.181–185, 2004.
- NYCZEPIR, A.P.; REILLY, C.C.; WOOD, B.W.; THOMAS, S.H. First record of *Meloidogyne partityla* on pecan in Georgia. **Plant Disease**, v.86, p.441, 2002.
- NYCZEPIR, A.P.; LEWIS, S.A. The influence of *Macroposthonia xenoplax* Raski on indole-3-acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) in peach. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.12, n.4, p.234, 1980.
- NYCZEPIR, A.P.; WOOD, B.W. Peach leaf senescence delayed by *Criconeumella xenoplax*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.20, n.4, p.585-589, 1988.
- 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.
- OKIE, W.R.; REIGHARD, G.L.; BECKMAN, T.G.; NYCZEPIR, A.P.; REILLY, C.C.; ZEHR, E.I.; NEWALL, W.C. Field-screening *Prunus* for longevity in the southeastern United States. **Hort Science**, v.29, p.673-677, 1994.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2003. 40p.
- OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P.; AMARAL, D.R.; NUNES, A.S.; PANTALEÃO, J.A.; COSTA, D.A. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.477–479, 2007.
- OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.40, n.2, p.401–404. 2010.
- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p.853-860, 2006a.

- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzymatic activity of native Central Amazonian rhizobia strains grown in different levels of acidity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.204-210, 2006b.
- 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.
- PARKER, N.; HAYWARD, A.C.; STIRLING, G.R. Effects of chitinolytic soil bacteria on root-knot nematode eggs. In: Abstract of Papers, 5th **International Congress of Plant Pathology**, Kyoto, Japan, Pp.157, 1998.
- PÉREZ, L.M.; POLANCO, R.; RIOS, J.C.; MONTEALEGRE, J.; VALDERRAMA, L.; HERRERA, R.; BESOAÍN, X. O aumento na endochitinases e β -1,3-glucanases no mutante Th650-NG7 do *Trichoderma harzianum* Th650, melhora a actividade de biocontrolo de *Rhizoctonia solani* tomate infectante. **IOBC/WPRS Bulletin**. v.30, n.6, p.135-138, 2007.
- RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M. ; FACHINELLO, J. C.; OLIVEIRA, R. P. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.095-101, 2009.
- RASEIRA, M.C.B.; QUEZADA A.C. **Pêssego produção**. Embrapa Clima Temperado. Brasília. EMBRAPA. 2003. (Informações Tecnológicas, frutas do Brasil n.49). 162p.
- 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.
- RITCHIE, D.F.; CLAYTON, C.N. Peach Tree Short Life: a complex of interacting factors. **Plant Disease**, St Paul, v.65, n.6, p.462-469, 1981.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T., SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p.155-161, 2000.
- ROMEIRO, R. da S. Isolamento seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. **Revista Ceres**, v.51, n.295, p.345-354, 2004.
- ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. 417p.
- ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos**. Viçosa Ed UFV, 2007, 269p.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 297p, 2001.
- ROMEIRO, R.S.; TAKATSU, A.; UESUGI, C.H.; MOURA, A.B.; SILVA, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e sua implicação na indução de resistência sistêmica a enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.1, p. 255, 1999.

SAHARAN, B. S. NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. LSMR-21, 2011.

SANTIN, R.C.M. **Potencial do uso dos fungos. *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*.** (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF). Porto Alegre, RS, 92p. 2008.

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.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, p.687-693, 2001.

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

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.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S. Isolamento e seleção massal de rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Ceres**, v.51, p.345-354, 2004.

SOLANO, B.R., BARRIUSO, J. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., p.41-54, 2008.

SOTTERO, A. N.; FREITAS, S.S.; MELO, A. M.T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista de Brasileira Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.225-234, 2006.

SOUZA JÚNIOR, I.T. de; MOURA, A.B.; SCHAFFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; GOMES, C.B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.45, n.11, p.1259-1267, nov. 2010.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivate and modern fungicides. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.106, p.476-489, 1999.

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

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **African Journal Biotechnology**, v.6, p.430-435, 2007.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111p.

UENO, B. Aumento da ocorrência da morte de pessegueiros devido ao inverno vigoroso e irregular no ano de 2007, no Rio Grande do Sul. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Tropical Plant Pathology**. Belo Horizonte, v.41, 2008. Anais... INDI, 2008. p.305.

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

VAN LOON L.C. Plant responses to plant growth promoting bacteria. **Europe Journal Plant Pathology**, v.119, p.243-254. 2007.

VERMA, S.C., LADHA, J.K., AND TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal Biotechnology**, v.91, p.127–141, 2001.

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

WEHUNT, E.; NYCZEPIR, A.P. Nematodes on peaches in the U.S. In: CHILDERS, N.F., SHERMAN, W.B. (eds.) **The Peach World Cultivars to Marketing**. Somerville: Somerset, 1988. Pp. 739-750.

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

WHIPPS, J.M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

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.

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

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.

APÊNDICES

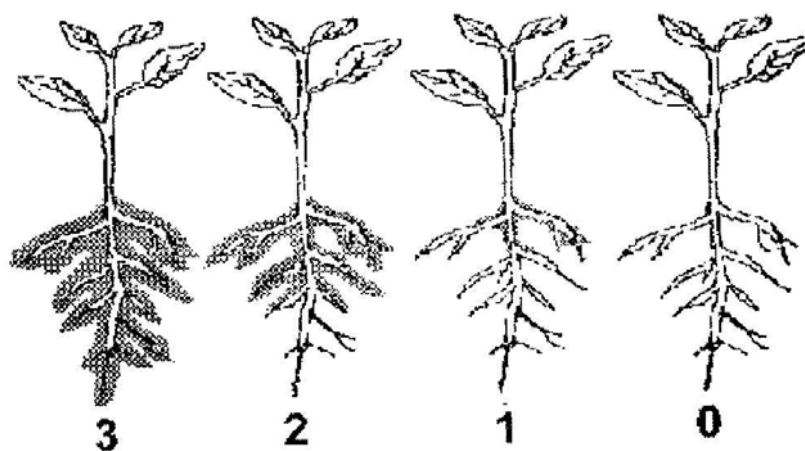
Apêndice 1 – Relação dos 13 isolados (IS) bacterianos que foram produtores de todos os compostos avaliados, nicho ecológico (NI ECOL), avaliadas em relação ao efeito (EFE) e amplitude (AMP) em relação aos testes de amido (AMI), amônia (AMO), antibiose (ANT), fosfatase (FOS), gelatina (GEL), Litmus® (LIT), quitina (QUI) e Tween80 (TWN).

IS	NI ECOL	LO ESP	AMI		AMO		ANT		FOS			GEL		LIT		QUI			TWN		SOMA	
			EFE	AMP	EFE		EFE	AMP	7D	14D	21D	4D	10D	7D	14D	21D	3D	7D				
61	Alho	Bulbo	1	3	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8		
89	Alho	Solo 1	1	2	1		1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8		
111	Alho	Solo 1	1	2	1		1	3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8		
135	Alho	Solo 1	1	2	1		1	3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8		
140	Alho	Solo 1	1	2	1		1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	8		
144	Alho	Solo 1	1	2	1		1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8		
592	Milho	Semente	1	1	1		1	3	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	8		
628	Solo	3	1	2	1		1	3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	8		
658	Solo	3	1	2	1		1	3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	8		
876	Solo	4	1	3	1		1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	8		
1391	Solo	12	1	2	1		1	3	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	8		
1486	Solo	13	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	8		
1986	Pessegueiro	Solo	1	1	1		1	3	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	8		

Apêndice 2 – Relação dos 99 isolados (IS) bacterianos que foram produtores de todos os compostos avaliados, nicho ecológico (NI ECOL), avaliadas em relação ao efeito (EFE) e amplitude (AMP) em relação aos testes de amido (AMI), amônia (AMO), antibiose (ANT), fosfatase (FOS), gelatina (GEL), Litmus® (LIT), quitina (QUI) e Tween80 (TWN) e avaliados sobre *Mesocriconea xenoplax*.

IS	NI ECOL	LO ESP	AMI		AMO		ANT		FOS			GEL		LIT			QUI			TWN		SOMA
			EFE	AMP	EFE		EFE	AMP	7D	14D	21D	4D	10D	4D	10D	7D	14D	21D	3D	7D	EFE	
23	Alho	Túnica	1	2	1		1	3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	
32	Alho	Túnica	1	2	1		0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	6	
66	Alho	Bulbo	1	2	1		1	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
81	Alho	Solo 1	1	3	1		1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	
185	Arroz	c/ lesão	0	0	0		1	3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	4	
223	Arroz	s/ lesão	0	0	0		0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	3	
306	Cebola	Esperm.	1	1	1		0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	
377	Alho	Túnica	1	1	1		1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	
390	Solo		1	1	1		1	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	
418	Meio	Bipolaris	1	1	1		1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	5	
419	Meio	Bipolaris	1	2	0		1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	7	
422	Meio	Bipolaris	1	1	1		1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	6	
439	Alho	Endofítica	1	1	1		1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
582	Milho		1	2	1		1	2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
695	Feijão	Flor	1	2	1		1	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
706	Tomate	Filosfera	1	2	1		1	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
756	Feijão	Solo	1	1	1		1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
886	Solo	4	1	2	1		1	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1021	Solo	7	1	2	1		1	3	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1039	Solo	8	1	1	1		1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1219	Solo	11	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1256	Solo	11	1	2	1		1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	7	
1258	Arroz	11	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1320	Meio	Bipolaris	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	7	
1341	Solo	12	1	2	1		1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	7	
1344	Solo	12	1	2	1		1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	7	
1391	Solo	12	1	2	1		1	3	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	8	
1421	Tomate	Rizosfera	1	1	1		1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	7	
1486	Solo	13	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	8	
1691	Figueira	16	1	1	1		1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	6	

ANEXOS



Anexo A - Esquema ilustrativo da intensidade de colonização radicular, com atribuição de notas de 0 a 3 onde, 0 = nenhuma colonização, 1 = colonização até $1/3$ das raízes, 2 = colonização de $1/3$ até $2/3$ das raízes e 3 = colonização de $2/3$ até a totalidade das raízes (HABE; UESUGI, 2000).