

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**RIZOBACTÉRIAS NO BIOCONTROLE DO NEMATOIDE  
CAVERNÍCOLA DA BANANEIRA**

**CELMA CARDOSO PEIXOTO**

**CRUZ DAS ALMAS - BA  
FEVEREIRO - 2011**

# **RIZOBACTÉRIAS NO BIOCONTROLE DO NEMATOIDE CAVERNÍCOLA DA BANANEIRA**

**CELMA CARDOSO PEIXOTO**

Engenheira Agrônoma  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Aldo Vilar Trindade

Co-orientador: Harllen Sandro Alves Silva

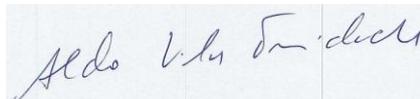
**CRUZ DAS ALMAS - BA  
FEVEREIRO - 2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

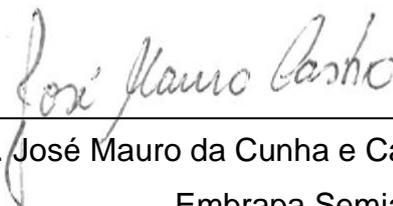
P379	<p>Peixoto, Celma Cardoso. Rizobactérias no biocontrole do nematoide cavernícola da bananeira / Celma Cardoso Peixoto. Cruz das Almas-Ba, 2011. 65f.; il.</p> <p>Orientador: Aldo Vilar Trindade. Co-orientador: Harllen Sandro Alves Silva.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.</p> <p>1.Banana - Cultivo. 2.Biocontrole - In vitro. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. II. Título.</p> <p>CDD: 634.772</p>
------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

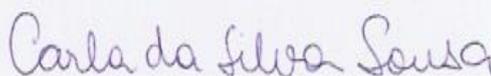
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**CELMA CARDOSO PEIXOTO**



Dr. Aldo Vilar Trindade  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)



Dr. José Mauro da Cunha e Castro  
Embrapa Semiárido



Dr<sup>a</sup>. Carla da Silva Sousa  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia-UFRB

**CRUZ DAS ALMAS - BA**  
**FEVEREIRO – 2011**

*A meus pais Claudemiro e  
Celidalva e a meu irmão Júnior pelo apoio  
incondicional em todos os momentos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida, pelo amparo, pela força.

A meus pais e a meu irmão, alicerces em todos os momentos, e a todos os meus familiares.

A meu orientador Dr. Aldo, pela confiança, amizade, conselhos e ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação profissional.

A meu co-orientador, Dr. Harllen, pela ajuda na realização deste trabalho, contribuindo com sua experiência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de realização do curso e, à Fapesb, pela concessão da bolsa.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos: Jorge, Liliane, Karol, Beth, Mary, Kleiton, Simara, Cláudio, Ana Paula, Luciano e Kaliane Silva pela convivência e momentos de descontração que, aliás, não foram poucos!

A João Vieira, técnico do Laboratório de Nematologia, pelo grande auxílio, pelos ensinamentos práticos, pela amizade, paciência e disposição em ajudar que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Kaliane Araújo, por ter me ajudado nos experimentos, contribuindo para a realização deste trabalho, além da amizade.

Ao pessoal dos Laboratórios de Nematologia, Entomologia, Fitopatologia, Virologia e Biologia Molecular e Nutrição Mineral de Plantas, na Embrapa, e Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, na UFRB, nos quais foram realizadas algumas etapas da pesquisa.

A todos os colegas do curso pelo convívio e amizade e aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação da UFRB pelo ótimo atendimento.

E a todos aqueles que, de alguma forma, participaram do desenvolvimento deste trabalho.

*“Pouca Ciência torna os homens orgulhosos;  
muita Ciência torna-os humildes. Assim, as espigas  
vazias elevam a cabeça soberba, enquanto as cheias  
inclinam-se humildemente para a terra”*

*(Anônimo)*

# ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	Página
INTRODUÇÃO .....	01
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Potencial do uso de rizobactérias como agentes de controle biológico do nematoide cavernícola da bananeira.....	03
1. Características gerais e importância econômica da bananicultura.....	06
2. Fitonematoides na cultura da bananeira.....	07
3. Rizobactérias como agentes de biocontrole de fitonematoides.....	14
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de rizobactérias no biocontrole de <i>Radopholus similis</i> .....	19
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	24
Resultados.....	34
Discussão.....	45
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## RESUMO

### Peixoto, C. C. Rizobactérias no bioncontrole do nematoide cavernícola da bananeira

A banana é cultivada em diversas regiões tropicais e sua produção e comercialização se constituem atividades de grande importância sócio-econômica. Porém, a bananicultura está sujeita a perdas causadas por fitonematoides, destacando-se *Radopholus similis*. O controle deste fitonematoide é realizado com o uso de nematicidas químicos, rotação de culturas e uso de cultivares resistentes, métodos que apresentam alguns entraves como elevados custos, difícil aceitação pelo produtor e dificuldade de obtenção de resistência associada a características agrônômicas desejáveis. Os obstáculos encontrados no controle de *R. similis* tem estimulado a busca de métodos alternativos, dentre os quais se destaca o emprego de rizobactérias como agentes de controle biológico. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos: a) isolar rizobactérias de diferentes espécies de plantas; b) selecionar isolados mediante testes de biocontrole *in vitro*; c) identificar os isolados mais promissores em nível de gênero; e d) avaliá-los quanto à capacidade de controle do nematoide e promoção de crescimento em mudas de bananeira. Foram obtidos 253 isolados e dentre os 152 testados, 23 apresentaram atividade nematicida em condições *in vitro* após 24 e 36 horas. Foram identificados cinco dos dez isolados mais promissores, sendo três pertencentes ao gênero *Bacillus* e dois ao *Pseudomonas*. Cinco dos dez isolados testados em casa de vegetação reduziram a população final de nematoides no solo sendo dois destes do gênero *Pseudomonas*. Porém, não foi verificado efeito no índice de crescimento das plantas, peso seco da parte aérea e rizoma, nível de dano nas raízes e número de nematoides no sistema radicular. Dentre as rizobactérias avaliadas, 15% apresentam potencial de biocontrole de *R. similis in vitro*, mas ainda são necessários mais estudos para verificar se estes efeitos realmente ocorrem em condições *in vivo*.

**Palavras-chave:** Bactérias, controle biológico, *Radopholus similis*, banana.

## ABSTRACT

### Peixoto, C. C. Rhizobacteria in the biocontrol of the burrowing nematode of the banana

Banana is cultivated in many tropical regions and its production and commercialization constitute activities of great importance economic partner. However, the banana crop is subject to losses caused by nematodes, standing out the *Radopholus similis*. The control of plant parasitic nematode is limited to the use of chemical nematicides, crop rotation and using of resistant cultivars, methods that present some difficulties as high cost, difficult acceptance by the producer and difficulty of obtainment of resistance associated with desirable agronomic characteristics. The obstacles found in the control of *R. similis* has stimulated the search for alternative methods among which stands out the use of rhizobacteria as biological control agents. In this sense the present study aimed: a) isolate rhizobacteria from different plant species; b) select isolates through *in vitro* testing of biocontrol; c) identify the most promising isolates at genus level, and d) evaluate them as ability of nematode biological control and growth promotion in banana plantlets. It were obtained 253 isolates and among the 152 isolates tested, 23 showed nematicidal activity *in vitro* after 24 and 36 hours. It were identified five of the ten isolates most promising, being three belonging to the genus *Bacillus* and two to the *Pseudomonas*. Five of the ten isolates tested under greenhouse conditions reduced the final population of nematodes in soil being two belonging to the genus *Pseudomonas*. However, there was no effect on the growth rate of plants, dry weight of shoot and dry weight of rhizome, damage level in roots and number of nematodes in the root system. Among the rhizobacteria evaluated, 15% present potential of biocontrol *in vitro* of *R. similis*, but further studies are needed to verify if these effects also occur under *in vivo* conditions.

**Key words:** Bacteria, biological control, *Radopholus similis*, banana.

# INTRODUÇÃO

A bananicultura apresenta considerável importância no cenário econômico nacional e internacional contribuindo com a renda de milhares de produtores. No Brasil, o Nordeste tem destaque, sendo esta a principal região produtora de banana. Porém, a produção de banana ainda sofre desfalques devidos, entre outros fatores, à incidência de doenças.

Os principais problemas fitossanitários que afetam a cultivo da bananeira no Brasil são o mal-do-panamá, as sigatokas amarela e negra, o moko, o mosaico e as estrias da bananeira cujos agentes causais são os fungos *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*, *Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella fijiensis*; a bactéria *Ralstonia solanacearum*, e os vírus “Cucumber mosaic virus” - CMV e “Banana streak virus” - BSV respectivamente. Além das doenças, fúngicas, bacterianas e viróticas, existem as causadas por nematoides que causam prejuízos anuais na agricultura mundial de cerca de 100 bilhões de dólares (DEMUNER et al., 2001; CORDEIRO & KIMATI, 2005; LOPES et al. 2008). Dentre as fitonematoses que ocorrem na bananeira, destaca-se aquela causada por *Radopholus similis*, conhecido vulgarmente como nematoide cavernícola. Este fitonematoide endoparasita de hábito migratório apresenta importância econômica para a bananicultura em virtude dos danos causados à planta, principalmente às cultivares suscetíveis e de importância comercial como a Grande Naine, e por estar distribuído nas mais diversas regiões produtoras.

Os sintomas de *R. similis* podem ser observados principalmente no sistema radicular. As fêmeas e juvenis penetram nas raízes da hospedeira e se alimentam do citoplasma das células corticais adjacentes formando galerias, que mais tarde coalescem formando necroses. Estas necroses tornam-se mais extensas, devido à atuação de microrganismos oportunistas, principalmente fungos e bactérias. Como resultado, tem-se o enfraquecimento do sistema de ancoragem da planta com conseqüente tombamento.

A dificuldade em se controlar o nematoide cavernícola tem estimulado pesquisas em todo o mundo, e o controle biológico tem recebido bastante atenção. A utilização de bactérias neste tipo de controle, atuando pela produção

de compostos tóxicos, alteração dos exsudados radiculares ou por indução de resistência na planta hospedeira, é um campo de pesquisa relativamente novo (FREITAS et al., 2005). Neste sentido, diversos gêneros de rizobactérias vêm sendo estudados quanto à capacidade de promoção de biocontrole de nematoides, incluindo *Bacillus* e *Pseudomonas*, e resultados satisfatórios vêm sendo obtidos. Dessa forma, o uso de rizobactérias pode ser vantajoso, tendo grande relevância no que diz respeito ao controle de fitonematoides, uma vez que são inócuas ao homem, além de oferecerem maior segurança para aplicadores e consumidores, podendo ainda ser integrado com outras práticas de controle de nematoides.

Pesquisas têm sido feitas em biocontrole de fitopatógenos com o uso de microrganismos benéficos na cultura da bananeira visando um cultivo mais sustentável. Desta forma, no Capítulo 1 deste trabalho são abordados, na forma de uma revisão bibliográfica, aspectos gerais e econômicos da bananicultura, características gerais de *R. similis* e potencial de uso de rizobactérias, enfatizando os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, no biocontrole de nematoides com destaque para o nematoide cavernícola.

Porém, em relação ao controle biológico de fitonematoides, ainda há necessidade de mais estudos. Neste sentido, o trabalho apresentado no Capítulo 2 se baseou na hipótese que bactérias habitantes da rizosfera de diferentes espécies de plantas com características nematicidas e cultivares de bananeira com alguma resistência a *R. similis*, seriam potenciais agentes de biocontrole deste fitonematoide. Partindo deste pressuposto, realizara-se o isolamento das rizobactérias, a avaliação do seu potencial biocontrolador em ensaios *in vitro* e a identificação em nível de gênero dos isolados mais promissores. Estes foram utilizados posteriormente em um ensaio de biocontrole *in vivo* com mudas micropropagadas de bananeira da cultivar Grande Naine.

---

# **CAPÍTULO 1**

**Potencial do uso de rizobactérias como agentes de controle  
biológico do nematoide cavernícola da bananeira**

---

## RESUMO

### **Peixoto, C. C. Potencial do uso de rizobactérias como agentes de controle biológico do nematóide cavernícola da bananeira**

Realizou-se uma revisão bibliográfica para levantamento de informações sobre a bananicultura, particularidades de *Radopholus similis* e o potencial de uso de rizobactérias no biocontrole de nematoides com destaque para o nematoide cavernícola. Inicialmente, foram discutidas as características gerais da bananeira, incluindo classificação botânica, centro de origem e importância econômica no mundo e no Brasil, sendo esta explicitada por meio de valores de produção e produtividade. Em seguida, foi feita uma descrição de *R. similis* dando enfoque à forma de ação do fitonematoide na planta hospedeira, aos sintomas e danos causados à planta e à produção, e aos principais métodos de controle, ou seja, o controle químico, a rotação de culturas e o uso de variedades resistentes, além do controle biológico desejado na atual agricultura. Estudos têm sido realizados visando à utilização da microbiota rizosférica para o biocontrole de nematoides, mas estes ainda são escassos, principalmente no caso específico de *R. similis*. Esta revisão finaliza com uma abordagem sobre pesquisas relacionadas ao potencial de uso de rizobactérias, com destaque para os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, no biocontrole de nematoides, enfatizando *R. similis*.

**Palavras chave:** Bactérias rizosféricas, biocontrole, *Radopholus similis*.

## ABSTRACT

### **Peixoto, C. C. Potential of the use of rhizobacteria as biological control agents of the burrowing nematode of the banana**

It was conducted a literature review for information survey about the banana crop, particularities of *Radopholus similis* and the potential of the use of rhizobacteria in the biocontrol of nematodes, with emphasis on the burrowing nematode. Initially was discussed the general characteristics of banana including botanical classification, origin center, and economic importance in the world and in the Brazil being this explained through of values of production and productivity. After, was made a description of *R. similis* focusing the mode of action of parasitic nematode in the host plant, symptoms and damages in the plant and in the production, and for the principal methods of control this nematode ie, the chemical control, the rotation of crops and use of resistant varieties, besides the biological control, wanted in the actual agriculture. Studies have been made aiming the use of the rhizospheric microbiota for the biocontrol of nematodes, but these are still scarce, especially in the case of *R. similis*. This review concludes with a discussion about researches related to the potential of the use of rhizobacteria, with emphasis on the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*, in the biocontrol of nematodes, emphasizing *R. similis*.

**Keywords:** Rhizospheric bacteria, biological control, *Radopholus similis*.

## 1. Características gerais e importância econômica da cultura da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea da classe Liliopsida, subclasse Liliidae, superordem Lilinae, ordem Zingibe (Scitamineae), família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, seção Eumusa (SILVA et al., 2002) originada de cruzamentos interespecíficos de *Musa acuminata* Colla com *M. balbisiana* Colla e apresenta, por isso, caracteres das duas espécies (SIMMONDS, 1973).

O centro de origem da maior parte do germoplasma de banana está localizado no Sudoeste Asiático, ocorrendo centros secundários na África Oriental, algumas ilhas do Pacífico e uma considerável diversidade genética na África Ocidental (CASTRO et al., 2008), regiões com clima tropical quente e úmido. Por ser típica destas regiões, a bananeira apresenta melhor desenvolvimento em locais com médias anuais de umidade relativa superiores a 80% e temperatura ótima de 28°C, considerando-se a faixa de 15°C a 35°C como os limites extremos para a exploração racional da cultura (BORGES & SOUZA, 2004).

Esta planta possui caule subterrâneo (rizoma), sistema radicular fasciculado, pseudocaule formado por bainhas foliares, terminando em uma copa de folhas compridas e largas e o número de frutos que produz depende da variedade (BORGES & SOUZA, 2004). Os frutos da bananeira se constituem produtos de grande importância econômica, sendo estes comercializados e consumidos em todo o mundo. O destaque no consumo advém do fato de a banana ser um alimento rico em vitaminas e minerais, principalmente potássio, e pelo seu sabor bastante apreciado pelos consumidores.

A Índia ocupou, em 2008, o primeiro lugar na produção mundial de banana, totalizando 23 milhões de toneladas, enquanto o Brasil ocupou o quarto lugar tendo produzido 7 milhões de toneladas. A produtividade do País ficou em torno de 14 t.ha<sup>-1</sup>, equivalente à quinta posição no *ranking* mundial (FAOSTAT, 2010). Segundo dados do IBGE, a produção de banana no Brasil em novembro de 2010 foi de 7.389.318 t, cultivadas em cerca de 527.745 ha, resultando em um rendimento médio de 14.002 kg.ha<sup>-1</sup>. A região Nordeste se destacou como a principal produtora do país com uma área total plantada de 250.981ha, com

produção de 2.983.430 t, rendendo, em média, 12.355 kg.ha<sup>-1</sup>. A Bahia produziu cerca de 1.367.957 t, sendo o maior estado produtor na região (IBGE, 2010).

O Brasil apresenta condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento da bananeira, sendo esta cultivada em todas as regiões do país. Dentre as principais variedades cultivadas, destacam-se a Maçã, Pacovan, Prata Anã, Terra (mercado interno) e Nanica, Nanicão e Grande Naine (exportação) (SILVA et al., 2004). Porém, a produção ainda sofre perdas consideráveis devido à incidência de pragas, doenças e manejo inadequado.

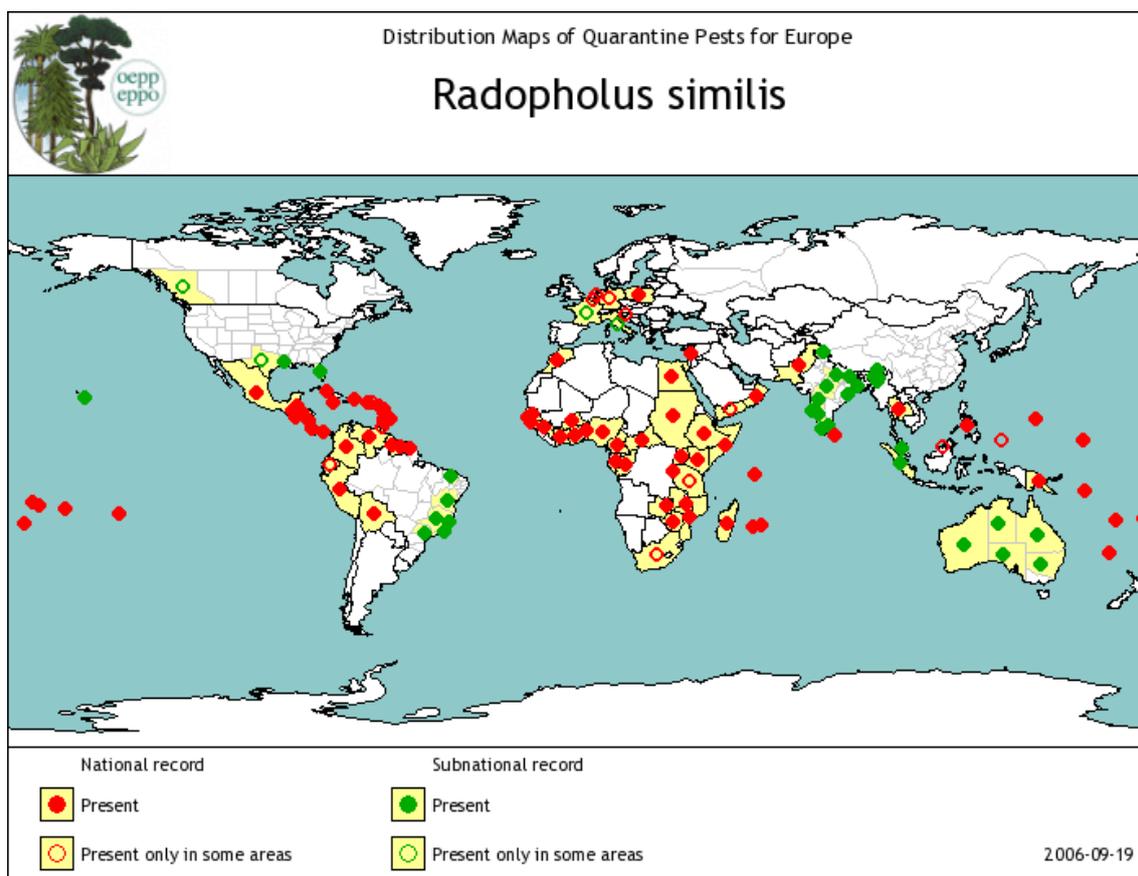
## **2. Fitonematoides na cultura da bananeira**

Na cultura da banana, são relatadas 146 espécies de nematoides parasitas ou associadas ao cultivo, distribuídas em 43 gêneros. Devido à frequência com que ocorrem e à intensidade dos danos causados, as espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (nematoides das galhas), *Pratylenchus coffeae* (nematóide das lesões), *Radopholus similis* (nematóide cavernícola) e *Helicotylenchus multicinctus* (nematóide espiralado) têm recebido maior atenção (RITZINGER & COSTA, 2004; KUBO et al., 2009).

### **2.1. *Radopholus similis*: o nematóide cavernícola da bananeira**

*Radopholus similis*, conhecido vulgarmente como o nematóide cavernícola da bananeira, é considerado o fitonematóide de maior importância para a cultura em razão dos danos causados à planta e pela sua ampla distribuição nas principais regiões produtoras do mundo (KIMATI et al., 2005) (Figura 1). A incidência de *R. similis* em várias cultivares de banana tem resultado em grandes perdas para os produtores e, nos países tropicais, estas são agravadas pelas condições ambientais como a temperatura, o tipo de solo, vegetações e estações chuvosas que favorecem o desenvolvimento, reprodução e a sobrevivência dos nematoides. Em plantações comerciais, perdas de produção de 10 a 50% foram documentadas (PINOCHET, 1986; DAVIDE, 1996). No Brasil, especificamente no subgrupo Cavendish, as perdas causadas por *R. similis* podem chegar até a 100%, principalmente, quando os pomares se encontram instalados em regiões de solos arenosos e temperaturas mais elevadas (EMBRAPA, 2009). Perdas de

80 a 100% já foram relatadas em bananais da cultivar Nanicao (ZEM & ALVES, 1981).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de *Radopholus similis*. Fonte: EPPO 2006.

O nematoide cavernícola, *Radopholus similis*, um endoparasito migrador pertencente à família Pratylenchidae e subfamília Pratylenchinae (TIHOHOD, 1997), é nativo do sudeste da Ásia. Em 1891, Cobb fez a primeira observação do nematoide em amostras de raízes coletadas na Ilha de Fiji. Desde então, tem sido encontrado em regiões tropicais e subtropicais, onde são cultivadas bananas e plátanos. Nas Ilhas Canárias, Israel, Taiwan e África Oriental, *R. similis* não havia sido detectado até cerca de 20 anos atrás (GOWEN & QUÉNÉHERVÉ, 1990). No Brasil, a espécie foi descrita em 1959 (CARVALHO, 1959), infectando mudas oriundas do litoral de São Paulo.

Quando em condições favoráveis, *R. similis* pode produzir novas gerações em cerca de três semanas, ou seja, é capaz de completar seu ciclo de vida

dentro da raiz do hospedeiro após 21 dias em temperatura de 24°C. Contudo, a duração deste ciclo pode variar de 20 a 25 dias em decorrência de fatores ligados à planta hospedeira ou ao ambiente (LOOS, 1962; SARAH et al., 1996). Este fitonematoide pode se reproduzir mediante anfimixia (VAN WEERDT, 1960; RIVAS & ROMÁN, 1985) ou partenogênese (BROOKS & PERRY, 1962; HUETTEL & DICKSON, 1981). No período reprodutivo, as fêmeas ovipositam quatro a cinco ovos por dia durante duas semanas e os juvenis eclodem após sete a oito dias em raízes de bananeira (COSTA, 2004). *R. similis* apresenta-se vermiforme tanto no estágio juvenil como no adulto, além de possuir um pronunciado dimorfismo sexual em que os machos apresentam aparelho digestivo degenerado, estilete atrofiado e são considerados não-parasitários (SARAH et al., 1996; COSTA & CORDEIRO, 2009).

Os danos causados no sistema radicular são atribuídos aos juvenis e fêmeas que penetram na região próxima à ponta da raiz, podendo a penetração ocorrer em toda a superfície. Uma vez no interior da raiz, os nematoides migram pelos tecidos radiculares movimentando-se por via intercelular no parênquima cortical. Com o estilete, perfura a parede celular e suga grande parte do citoplasma das células adjacentes obtendo, assim, seu alimento (THORNE, 1961; GOWEN & QUÉNÉHERVÉ, 1990; KUBO et al., 2009).

O movimento migratório do nematoide resulta na desintegração destes tecidos e formação de cavidades, advindo daí a denominação vulgar de nematoide cavernícola. As lesões e cavidades marrom-avermelhadas progridem para necroses, podendo estender-se para todo o córtex, sem atingir o cilindro central. Porém, o ataque posterior de micro-organismos, principalmente fungos, faz com que as necroses tornem-se enegrecidas e extensas, podendo atingir o cilindro central, além de tornar a raiz fraca e quebradiça (O'BANNON, 1977; SARAH et al., 1996; ROSSI, 2009).

Após completar o seu ciclo, o parasito pode voltar ao solo à procura de novas plantas hospedeiras ou permanecer em pedaços de rizoma no campo. Sem alimento, ele pode sobreviver pouco menos do que seis meses com reservas de seu próprio organismo (ROSSI, 2009).

Sua dispersão ocorre, na maioria dos casos, pelo material propagativo contaminado (RITZINGER & COSTA, 2004). Outras formas de disseminação incluem os implementos agrícolas contaminados, o trânsito de trabalhadores e

animais, o escoamento de água em áreas de declive e as águas de rega (COSTA & CORDEIRO, 2009).

## 2.2. Sintomas

*Radopholus similis* é capaz de penetrar em qualquer parte da raiz, migrando para os tecidos internos, podendo atingir o rizoma (Figura 2) (THORNE, 1961). Com a destruição dos tecidos das raízes, a absorção de água e nutrientes é prejudicada, enfraquecendo o sistema de ancoragem da planta. Conseqüentemente, as plantas podem apresentar crescimento reduzido, menor número e tamanho de folhas, redução do peso do cacho e da vida produtiva, prolongamento do ciclo vegetativo e aumento do período entre colheitas. Na parte aérea, os sintomas são caracterizados pela clorose foliar, redução do crescimento, pseudocaulis finos e redução no tamanho dos cachos, como consequência da diminuição da absorção de água e nutrientes. Frequentemente, ocorrem casos de tombamento (Figura 3), com exposição do rizoma necrosado, pela ação do vento ou pelo peso do próprio cacho (SARAH et al., 1996; KIMATI et al., 2005; MICHEREFF et al., 2005).



**Figura 2.** Necroses na raiz e rizoma causadas por *Radopholus similis*. Foto: Michael McClure, 2005.



**Figura 3.** Tombamento da bananeira resultante do ataque de *Radopholus similis*.  
Fonte: Nemapix Archive, 2005.

### 2.3. Estratégias de controle

As principais estratégias empregadas no controle de *R. similis* na bananeira incluem a aplicação de agroquímicos, a rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes. Atualmente o controle biológico vem recebendo mais atenção por parte dos pesquisadores devido, principalmente, à crescente preocupação com a preservação do meio ambiente.

O controle de nematoides por via química consiste, basicamente, no uso de substâncias denominadas nematicidas que se caracterizam por apresentar ação direta sobre estes fitopatógenos (SALES JR. et al., 2005). A aplicação de nematicidas químicos constitui-se em um dos principais métodos de controle de *R. similis*, sendo que sua eficiência está condicionada ao tipo de solo em que são aplicados, à dosagem e aos métodos de aplicação, bem como à época e à frequência do tratamento (COSTA & CORDEIRO, 2009). Segundo Moreira (1999),

a primeira aplicação do nematicida sistêmico no bananal para o controle do *R. similis* deverá ser feita logo após a colheita do primeiro cacho, quando então ele já é considerado adulto, e se faz necessária uma segunda aplicação por ocasião do primeiro desbaste, após a colheita, para que ocorra um controle efetivo. Contudo, o controle químico apresenta uma série de inconvenientes. Dentre eles, destacam-se o alto custo dos produtos, os resíduos nos frutos, a intoxicação pela exposição aos produtos, as contaminações de fontes de água, a destruição da microflora do solo (VILAS BOAS et al., 2002) e, em longo prazo, pode favorecer a indução de resistência, dificultando a eficácia do controle de nematóides aos nematicidas.

Dentre os métodos culturais de controle de nematoides, tem-se a rotação de culturas. O método se baseia no cultivo de espécies vegetais não hospedeiras do nematoide que se quer combater. Portanto, para a adoção da rotação de culturas é importante que se tenha o conhecimento das hospedeiras de cada nematoide e de quais espécies ocorrem na área a ser plantada (RITZINGER & COSTA, 2004). A rotação de culturas pode afetar a sobrevivência de pragas e patógenos, incluindo nematoides, pelo fato de proporcionar a quebra do ciclo desses organismos por um determinado período. Ferraz & Freitas (2009) afirmaram que o uso de plantas antagonistas em esquemas de rotação ou plantio consorciado tem se mostrado uma alternativa bastante atrativa para o controle de nematoides. No Quênia, Charles (1995) testou o consórcio de banana com coentro (*Coriandrum sativum*), gergilim (*Sesamum indicum*), crotalária (*Crotalaria juncea*), cravo de defunto (*Tagetes erecta*) e cálamo-aromático (*Acorus calamus*) como alternativa à aplicação de carbofuran. Comparadas à testemunha, todas as plantas antagonistas reduziram as populações de *R. similis*, *Rotylenchulus reniformis*, *M. incognita*, *H. multicinctus* e *Hoplolaimus indicus*. Contudo, a relutância dos agricultores em adotar plantas antagonistas para controlar fitonematoides ainda é a principal barreira para o seu uso (FERRAZ & FREITAS, 2009). Esse comportamento se deve, principalmente, a razões de ordem econômica.

O uso de cultivares resistentes no controle de nematoides é uma alternativa de grande interesse para a produção de banana (COSTA & CORDEIRO, 2009). Plantas são consideradas resistentes quando possuem a habilidade de inibir a reprodução da espécie do nematoide. Portanto, uma planta

suscetível é intolerante, ao parasitismo do nematóide, ou pode ser tolerante, permitindo o desenvolvimento do nematóide mantendo porém a produção econômica (RITZINGER & FANCELLI, 2006). Especificamente na bananicultura, sabe-se que existem diferentes graus de suscetibilidade entre as cultivares sendo necessário considerar esta característica em cultivares comerciais. As cultivares FHIA-18, Maravilha, Thap Maeo e Pacovan Ken apresentaram resistência parcial a *R. similis* em condições de casa de vegetação, porém, a complexidade genética da banana ainda é o maior entrave para a produção de cultivares resistentes (PINOCHET, 1988; STOVER & BUDDENHAGEN, 1986; RITZINGER & COSTA, 2004). Além disso, apresentar resistência juntamente com características agrônômicas desejáveis requer um tempo considerável para a sua obtenção.

O controle biológico de nematoides pode ser definido como o ato de se aplicar organismos diretamente na planta ou no solo com o intuito de impedir o desenvolvimento, reprodução e estabelecimento dos nematoides no hospedeiro. Com isso, busca-se minimizar os danos causados pelo fitopatógeno ou evitar que tais danos ocorram. Sikora & Hoffmann-Hergaten (1992) afirmaram que os fitonematoides coexistem na rizosfera com grande diversidade de microrganismos, muitos dos quais foram isolados e identificados como antagonistas de nematoides, uma vez que exercem algum tipo de controle biológico.

Diversos microrganismos como fungos e bactérias têm sido estudados quanto à capacidade de promoverem o biocontrole de nematoides. Dentre os fungos, destacam-se *Acremonium strictum* Gams, *Allomyces anomalus* Emerson, *Arthrobotrys arthrobotryoides* (Berlese) Lindau, *A. brochopaga* (Drechsler) Schenck, Kendrick & Pramer, *Catenaria* spp., *Coniothyrium fuckelli* Sacc., *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten, *Dactylella candida* (Nees) Hoog & van Oorschot, *D. oviparasitica* Stirling & Mankau, *Drechmeria coniospora* (Drechsler) Gams & Jansson, *Exophiala pisciphilia* McGinnis & Ajello, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. semitectum* Berk. & Rav., *Gliocadium roseum* Bain, *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe amend. Walker & Koske, *Harposporium* spp., *Hirsutella* spp., *Humicola grisea* (van der Laan) Vinduska, *Lagenidium caudatum* Barron, *Macrobotrophthora vermicola* (McCulloch) Tucker, *Monacrosporium* spp., *Nematoctonus* spp., *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, *P. nostocis* Dunn considerada espécie mutante de *P.*

*lilacinus*, *Periconia macrospinosa* Lefebre & A.G. Johnson, *Rhopalomyces elegans* Corda, *Scytalidium fulvum* Morgan-Jones & Gintis, *Stagnospora heteroderae* (Carris) Glawe & Morgan-Jones, *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium*) e *Lecanicillium psalliotae* (Treschow) Zare & Gams. Também são relacionadas diversas espécies de bactérias, como *Clostridium butyricum* Prazmowski, *Desulfovibrio desulfuricans* (Beijerinck) Kluyver & van Niel, *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr, *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces anulatus* (Beijerinck) Waksman; porém em número bem menor quando comparado aos fungos. Algumas espécies de bactérias como *P. penetrans* são parasitas obrigatórios de fitonematoides que agem mediante produção de toxinas, metabólitos ou substâncias resultantes da fermentação bacteriana sobre os ovos ou outras formas do ciclo de vida do nematoide (RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1991; STIRLING, 1991; CHEN et al., 2004; GIARETTA, 2008).

Estudos com micro-organismos para o biocontrole de *R. similis* mostram que fungos e bactérias promovem efeito deletério na sobrevivência do nematoide. Stolf et al. (2006) obteve 79,5% de biocontrole de *R. similis* em mudas de bananeira da cultivar Williams inoculadas com *Trichoderma* spp. Mendonza & Sikora (2009), trabalhando com a bactéria *Bacillus firmus* observaram a ocorrência de 63,7% de biocontrole de *R. similis* em mudas da cultivar Grande Naine. Desse modo, o controle biológico é considerado uma alternativa promissora que pode ser utilizada juntamente com outras práticas para o controle de fitonematoides (FERNÁNDEZ et al., 2003), incluindo *R. similis*.

### **3. Rizobactérias como agentes de biocontrole de fitonematoides**

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas ou PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) constituem um grupo muito amplo de micro-organismos, uma vez que, sob essa designação, incluem-se quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (FREITAS, 2007). Este grupo de bactérias é considerado importante, pois parte destes micro-organismos é capaz de promover o controle biológico de agentes causadores de enfermidades em plantas, sendo

investigados em todo o mundo com vistas à redução do uso de agrotóxicos na agricultura (ROMEIRO & GARCIA, 2009).

Rizobactérias são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas promovendo um aumento no desenvolvimento e na produção do hospedeiro, devido à promoção de crescimento (efeito direto) ou biocontrole de doenças e pragas (efeito indireto). A promoção de crescimento é considerada indireta quando a planta está sendo infectada por um patógeno e as rizobactérias atuam como agentes de controle biológico por meio da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço,  $Fe^{+3}$  e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (SILVEIRA, 2001; MARIANO et al., 2004).

A maioria das rizobactérias com potencial para o biocontrole de fitopatógenos tem a capacidade de produzir toxinas e outros metabólitos com atividade nematicida no local de estabelecimento do fitopatógeno. Os mecanismos envolvidos no biocontrole de nematóides envolvem a degradação de exsudatos radiculares, devido à ação das bactérias nas lecitinas, com consequente redução do estímulo à eclosão e a interferência no processo de reconhecimento da raiz pelo nematoide (OOSTENDORP & SIKORA, 1990; FILHO & MINHONI, 2007).

Siddiqui & Mahmood (1999) afirmaram que as rizobactérias usadas como antagonistas biológicos de fitonematoides podem ser agrupadas em bactérias parasitas e não parasitas. *Pasteuria penetrans* se destaca dentre as bactérias parasitas obrigatórias de fitonematoides. Algumas bactérias não parasitas também podem apresentar capacidade para o controle biológico de nematoides, dentre as quais estão: *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Desulfovibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. e *Streptomyces* spp. (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999). Bactérias parasitas como *P. penetrans* possuem a capacidade de parasitar mais de trezentas espécies de nematoides e podem permanecer dormentes no solo por longos períodos na forma de endósporos. Outra estratégia é encontrada em bactérias não parasitárias: promover efeitos adversos na relação entre a planta infectada e o fitonematoide. Essas bactérias regulam o comportamento do nematoide durante a fase inicial de penetração na raiz da planta hospedeira (SIKORA et al., 1989; FILHO & MINHONI, 2007; FREITAS et al., 2010).

Dentre os gêneros de nematoides alvos das rizobactérias, encontram-se *Belonolaimus*, *Mesocriconema*, *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus* e *Tylenchorhynchus* (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

Além de apresentarem potencial de biocontrole de fitonematóides, as rizobactérias têm uma série de vantagens sobre os nematicidas ou mesmo sobre outros agentes de controle biológico, dentre elas: 1) são fáceis de serem produzidas em escala massal, 2) são de fácil armazenamento, 3) são adaptáveis à tecnologia de formulação e 4) não requerem manipulação genética (SIKORA & HOFFMANN-HERGATEN, 1992). Todavia muito pouco se sabe sobre as rizobactérias no que diz respeito à sua variedade de espécies e diferenças entre isolados de uma mesma espécie, assim como a gama de fatores que afetam sua eficiência no controle de nematóides, como tipo de solo, espécie de planta hospedeira e de nematóide a ser controlado (FREITAS, 2009).

### **3.1. Gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* inclui uma variedade de importantes espécies Gram-positivas com propriedades antagônicas a diversos agentes causadores de doenças em culturas comerciais como o tomate e a banana. Estes micro-organismos são bons secretores de proteínas e metabólitos, fáceis de cultivar e altamente eficientes no controle de pragas e doenças (BERG & HALLMANN, 2006). Segundo Melo (2010), bactérias do gênero *Bacillus* apresentam resistência à dessecação e são capazes de formar endósporos, características vantajosas para um agente de biocontrole.

Os mecanismos de ação de *Bacillus* spp. incluem competição por espaço e nutrientes (HANDELSMANN & STABB, 1996), antibiose (LOEFFLER et al., 1986), indução de resistência (KLOEPPER & RYU, 2006) e promoção de crescimento de plantas (KLOEPPER et al., 2004). Este gênero vem sendo considerado como um promissor agente de controle biológico de fitonematoides devido, justamente, à capacidade de produção de endósporos que, conforme citado anteriormente, são tolerantes à dessecação do solo e ao calor extremo (WELLER, 1988; MELO, 2010), fazendo com que a célula suporte longos períodos no campo (MADIGAN et al., 2003).

Estudos têm comprovado a existência do potencial antagônico de bactérias do gênero *Bacillus* a fitonematoides. Um isolado de *Bacillus* spp. reduziu em até 53% o número de galhas de *M. incognita* em tomateiros, sendo um dos mais eficientes entre os 156 isolados testados por Habe (1997). Araújo & Marchesi (2009), trabalhando com a aplicação de *Bacillus subtilis* em mudas de tomateiro, observaram que houve efeito sobre a reprodução de *Meloygogine* spp., sendo este evidenciado pela redução do número de massas de ovos nas raízes.

A espécie *Bacillus firmus* é o agente biológico utilizado na composição de um bionematicida denominado Bionem WP registrado em Israel (KEREN-ZUR et al., 2000), e já foi demonstrado que este produto apresentou efeito de biocontrole de *R. similis* sob condições *in vitro* (MENDONZA et al., 2008).

Em Cuba, a determinação da atividade nematicida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, estirpe LBT-3, e sua subsequente propagação nas áreas agrícolas, principalmente naquelas cultivadas com bananas e plátanos, tem constituído uma importante alternativa de controle biológico contra *R. similis* e *M. incognita* (FERNANDEZ et al., 2003) permitindo uma economia significativa de divisas que, por sua vez, reduz as importações de pesticidas resultando em proteção do ambiente. O emprego da cepa LBT-3 como nematicida biológico também foi introduzido na produção de bananas e plátanos na Província de Camaguey, onde 6.790 hectares foram tratados com este nematicida biológico entre os anos de 1997 e de 2001 (MENA et al., 2003).

### **3.2. Gênero *Pseudomonas***

Dentre as diversas bactérias isoladas da rizosfera, e que vêm sendo estudadas como agentes de biocontrole, as do gênero *Pseudomonas*, caracterizadas como bastonetes Gram-negativos, têm se destacado pela sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias, fungos, nematoides e vírus, agentes fitopatogênicos que poderiam chegar a reduzir significativamente a produtividade das culturas em condições de casa de vegetação e campo (HAAS & DÉFAGO, 2005; MENDEZ, 2007).

São inerentes às bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, mecanismos de ação antagônica que envolvem a produção de compostos bacterianos, como sideróforos, que possibilitam a competição por ferro, ácido

cianídrico (HCN) e antibióticos (LOPER, 1988; HAMDAN et al., 1991, MAZZOLA et al., 1992; THOMASHOW & WELLER, 1996; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; HAAS & DEFAGO, 2005; BERG & HALLMANN, 2006). Além destes efeitos, essas bactérias são capazes de induzir resistência sistêmica na planta hospedeira durante a colonização das raízes, fazendo com que a planta tolere o ataque de vários fitopatógenos do solo (WELLER & COOKE, 1983; HAAS & DEFAGO, 2005).

Segundo Kluepfel et al. (1993), *Pseudomonas* spp., principalmente aquelas pertencentes ao grupo das fluorescentes, têm sido as antagonistas mais eficazes a fitonematoides. Cepas de *P. fluorescens* proporcionaram efeito tóxico a *Heterodera schachtii*, o nematoide do cisto da beterraba açucareira, em condições de casa de vegetação e campo (OOSTENDORP & SIKORA, 1989). Efeito semelhante foi observado sobre *M. javanica*, em condições *in vitro* e *in vivo*, utilizando mudas de tomateiro (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003). Outras cepas de *P. fluorescens* e *P. putida* demonstraram atividade antagonista contra *R. similis* e *Meloidogyne* spp. em cultivos de banana, milho e tomate (BECKER et al., 1988; AALTEN et al., 1998).

---

## **CAPÍTULO 2**

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* de rizobactérias no biocontrole de  
*Radopholus similis***

---

## RESUMO

### Peixoto, C. C. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de rizobactérias no biocontrole de *Radopholus similis*

*Radopholus similis* é o fitonematoide de maior importância econômica para a bananeira. A dificuldade em se controlar este nematoide tem estimulado o estudo de métodos alternativos. Pesquisas têm mostrado que rizobactérias são capazes de produzir metabólitos com atividade nematicida. Este trabalho teve como objetivos isolar rizobactérias de diferentes espécies de plantas, avaliá-las quanto ao potencial de biocontrole de *R. similis in vitro*, realizar a identificação em nível de gênero dos isolados mais promissores e avaliá-los quanto ao potencial de biocontrole e promoção de crescimento *in vivo*. Rizobactérias foram isoladas de solo rizosférico de duas cultivares de bananeira (Prata Comum e Prata Anã) e de duas espécies antagonistas a nematoides (crotalária e cravo-de-defunto), mediante técnica de diluição seriada e plaqueamento nos meios de cultura sólidos Tryptic Soy Agar e King B-agar. Posteriormente, realizou-se o cultivo dos isolados em meio líquido para a obtenção dos metabólitos, testes preliminares *in vitro* e a avaliação propriamente dita que consistiu na quantificação do número de nematoides mortos após 24 e 36 horas em contato com o metabólito. Os isolados promissores nos testes *in vitro* foram submetidos à identificação em nível de gênero mediante técnica de PCR com primers para os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Foram obtidos 253 isolados, sendo 134 em meio King B e 119 em TSA. Dentre os 152 isolados avaliados, 23 apresentaram efeito tóxico a *R. similis* após 24 e 36 horas. Dos 10 isolados submetidos à identificação, três corresponderam ao gênero *Bacillus* e dois ao *Pseudomonas*. Cinco destes apresentaram efeito deletério sobre a população de *R. similis* no solo no experimento *in vivo*. Não houve efeito dos isolados sobre o crescimento das mudas de bananeira. As bactérias avaliadas apresentam potencial de antagonismo a *R. similis*.

**Palavras chave:** Bactérias rizosféricas, nematoide cavernícola, controle biológico.

## ABSTRACT

### Peixoto, C. C. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of rhizobacteria in the biocontrol of *Radopholus similis*

*Radopholus similis* is the parasitic nematode of plants of more economic importance to banana crop. The difficulty to control this nematode has stimulated the study of alternative methods. Researches have shown that rhizobacteria are able to produce metabolites with nematicidal activity. This work aimed isolate rhizobacteria from different species of plants, evaluate them as for the potential biocontrol of *R. similis in vitro*, do the identification at genus level of the isolates more promising and evaluate them as for the biocontrol potential and growth promotion *in vivo*. Rhizobacteria were isolated from rhizospheric soil of two banana cultivars (Common Silver and Dwarf Silver) and two species antagonistic to nematodes (crotalaria and marigold) through the use of serial dilution and plating on solid medium Tryptic Soy Agar and King B-agar. Posteriorly was made the cultivation of the isolates in liquid medium to obtaining metabolites, preliminary tests *in vitro* and the evaluation itself that was to quantification of the number of dead nematodes after 24 and 36 hours in contact with the metabolite. The promising isolates were submitted to identification at genus level by PCR using primers for the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*. Were obtained, 253 isolates, being 134 in the culture medium King B-agar and 119 in Tryptic Soy Agar. Among the 152 isolates evaluated 23 showed toxicity to *R. similis* after 24 and 36 hours. Of the 10 isolates submitted to identification at genus level three corresponded to the *Bacillus* genus and two to the *Pseudomonas*. Five of these isolates had a deleterious effect on the population of *R. similis* in the soil in the *in vivo* experiment. There was no effect of isolates on the growth of banana plantlets. The bacteria evaluated have antagonistic potential against *R. similis*.

**Keywords:** Rhizospheric bacteria, burrowing nematode, biological control

## INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa* spp.) tem como um dos principais problemas fitossanitários a nematose causada pelo endoparasita migrador *Radopholus similis*, conhecido vulgarmente como nematoide cavernícola. A ocorrência desta moléstia, principalmente em cultivares comerciais e suscetíveis como a Grande Naine, provoca enormes prejuízos aos produtores de banana em todo o mundo.

A infecção tem início quando as fêmeas e juvenis penetram no sistema radicular do hospedeiro e, com o estilete, perfuram o citoplasma de células vizinhas, de onde obtêm o alimento, resultando na formação de cavidades no interior das raízes e diminuição da capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta. Altas infecções de *R. similis* provocam rachaduras ao longo das raízes e estes danos podem ser agravados pela penetração de micro-organismos secundários (KUBO et al., 2009). Conseqüentemente, as raízes tornam-se necrosadas, sendo frequentes os casos de tombamento de plantas com perdas na produção devido às injúrias causadas nos frutos.

O controle dos nematoides pode ser feito por diferentes métodos, destacando-se o químico, o emprego da rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes. Porém, estes métodos apresentam algumas barreiras para a sua adoção como os custos elevados e dificuldade de aceitação pelo produtor por razões de ordem econômica. Métodos alternativos como o controle biológico tem recebido maior atenção e destaque nos últimos anos pelo fato de minimizar danos ambientais e contaminação do homem, animais e dos frutos, contribuindo para a preservação dos recursos naturais e sustentabilidade dos agroecossistemas (COIMBRA & CAMPOS, 2005). Além disso, o controle biológico apresenta maior vantagem econômica quando comparado aos métodos químicos convencionais que geralmente têm elevados custos de utilização.

Estudos têm demonstrado que micro-organismos habitantes da rizosfera, conhecidos como rizobactérias, destacando-se os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, conseguem promover o biocontrole de doenças de plantas, incluindo as nematoses, devido à capacidade de alterar a reprodução e orientação do parasita em direção às raízes da planta hospedeira (ARAUJO et al., 2002).

Várias destas bactérias rizosféricas produzem metabólitos *in vitro*, que podem inibir a eclosão e a mobilidade dos juvenis de segundo estágio (J2) (KERRY, 2000). O efeito nematicida e nematostático de filtrados de culturas bacterianas foi inicialmente demonstrado por Iizuka et al. (1962), trabalhando com 134 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, dos quais 69 apresentaram intensa atividade nematicida contra *Meloidogyne* sp. Os mesmos autores demonstraram que filtrados de cultura de nove isolados de *Enterobacter* apresentaram alta atividade nematicida. Filtrados de cultura de *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, crescida em meio Tryptic Soy Broth (TSB), também mostraram atividade nematicida a ovos e juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood (OKA et al., 1993). Pesquisas mais recentes mostraram que a bactéria *Corynebacterium paurometabolum* apresentou efeito tóxico sobre ovos e juvenis em condições de laboratório indicando a ocorrência de produção de metabólitos antimicrobianos (FERNÁNDEZ et al., 2003).

Algumas rizobactérias são capazes de promover o biocontrole de nematoides sob condições *in vivo*. Um isolado de *B. cereus* proporcionou redução de 8,8% do número de galhas *M. javanica* em plantas de tomate sob condições de casa de vegetação (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2010). Chaves et al. (2009), selecionando micro-organismos para o biocontrole do *R. similis* observaram a ocorrência de um percentual de biocontrole de 92% proporcionado por *Bacillus*, além de incrementos significativos na produção de massa verde em mudas de bananeira da cultivar Grande Naine.

Dessa forma, a utilização de rizobactérias no controle biológico de fitonematoides em cultivos comerciais por meio da produção de compostos nematicidas constitui-se fonte relevante de investigações. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos isolar rizobactérias de diferentes espécies de plantas, avaliá-las no biocontrole de *R. similis* em condições *in vitro*, realizar a identificação em nível de gênero dos isolados mais promissores na avaliação anterior e avaliá-los quanto à capacidade de biocontrole e promoção de crescimento em condições *in vivo* utilizando mudas da cultivar Grande Naine.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Isolamento e preservação das rizobactérias

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para o isolamento das rizobactérias, foram utilizadas amostras de raízes das cultivares de bananeira Prata Anã e Prata Comum, obtidas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa, sendo ambas consideradas moderadamente resistentes ao nematoide cavernícola (EMBRAPA, 2009). Este procedimento foi aplicado também a amostras de raízes de plantas de crotalária (*Crotalaria juncea*) e de cravo-de-defunto (*T. patula* L.), oriundas de cultivos orgânicos, que caracterizam-se por apresentar propriedades nematicidas. Adotou-se a técnica da diluição seriada, sendo que as amostras de raízes foram pesadas (10g) e colocadas em frascos de Erlenmeyers contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Adicionaram-se duas gotas de Tween 80 e, posteriormente, os frascos contendo as amostras foram submetidos à agitação por 20 minutos. Em seguida, foram feitas as diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ), semeio de 100  $\mu$ L de cada diluição em placas de Petri contendo os meios de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) e King B-agar, seguido de espalhamento com alça de Drigalsky, e incubação em câmara de crescimento tipo B.O.D a 28°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias individualizadas e divergentes morfológicamente foram purificadas e preservadas. Para o processo de preservação, os isolados obtidos foram repicados em tubos de ensaio contendo os mesmos meios de cultura utilizados no isolamento, sendo incubados por 24 horas. Após este período foram adicionados, em cada tubo, 2 mL de meio de cultura líquido NBY (caldo nutriente suplementado com levedura) (SCHAAD, 1988) contendo 15% de glicerina seguido de agitação em vórtex. As suspensões obtidas foram colocadas em tubos criogênicos e em seguida armazenados em ultrafreezer a -80°C.

### 2. Extração dos metabólitos bacterianos

Os isolados preservados foram repicados, com auxílio de alça de platina, para placas de Petri contendo os meios de cultura utilizados no isolamento, sendo

incubados em B.O.D a 28°C por 48 horas. Posteriormente, as culturas crescidas foram novamente repicadas para frascos de Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido Tryptic Soy Broth (TSB) seguido de incubação por 15 dias. Após este tempo, o meio com a cultura crescida foi acondicionado em tubos falcon que foram centrifugados a 10.000 rpm (7504 g) por 15 minutos a 25°C, obtendo-se o sobrenadante com os metabólitos bacterianos. Estes sobrenadantes foram colocados em frascos de vidro (Figura 1) esterilizados e armazenados em freezer a -4°C.



**Figura 1.** Frascos de vidro com sobrenadante contendo metabólitos bacterianos.

### 3. Avaliação do biocontrole em ensaios *in vitro*

Para obtenção do inóculo de *R. similis*, o nematóide foi multiplicado em mudas micropropagadas de bananeira Grande Naine, cultivadas em vasos com capacidade para 3kg, contendo solo previamente autoclavado, por 4 meses (Figura 2).



**Figura 2.** Mudas micropropagadas da cultivar Grande Naine utilizadas para multiplicação do inóculo de *Radopholus similis*.

Para a extração dos nematoides que foram utilizados nos bioensaios, pesaram-se 10g de raízes de bananeira, triturando-os em liquidificador com 250 mL de água, por 30 segundos, na velocidade média. A suspensão resultante da trituração foi colocada em peneiras sobrepostas de 40 mesh (superior), 100 mesh (meio) e 400 mesh (inferior). Em seguida, recolheu-se o material retido na peneira de 400 mesh para um béquer com o auxílio de uma pisseta. Esta alíquota foi vertida em tubos de centrifuga. Procedeu-se à centrifugação a 3000 rpm (1814,4 g), durante 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e adicionaram-se 35 mL de solução de sacarose a 50% em cada tubo, misturando com um bastão de vidro. Realizou-se novamente o balanceamento e centrifugação por 2 minutos a 2000 rpm (806,4 g). Em seguida, verteu-se o sobrenadante em peneira de 500 mesh inclinada, sob torneira, retirando todo o excesso de sacarose e, com uma pisseta contendo água destilada esterilizada, recolheram-se os nematoides em béquer com capacidade para 100 mL (COLLEN & D'HERDE, 1972 modificado).

Antes de se iniciarem os testes de biocontrole, realizou-se um ensaio preliminar para avaliar a mortalidade dos nematoides em função do tempo de contato com os metabólitos bacterianos. A avaliação foi feita utilizando-se lâmina de Peters e microscópio óptico, após 12, 18, 24, 30, 36, e 42h de contato do nematoide com a suspensão de metabólitos bacterianos. Foram utilizados 50 $\mu$ L de uma suspensão aquosa contendo 10 nematoides e 150 $\mu$ L do sobrenadante com o metabólito bacteriano, sendo estes colocados em eppendorfs que foram posteriormente incubados em B.O.D. a 25°C. Este experimento constou de três tratamentos sendo estes compostos por metabólitos bacterianos oriundos de dois isolados bacterianos (3KB-PC e 1KB-PC) e o controle, sendo este constituído de 50 $\mu$ L da suspensão aquosa com 10 nematoides e 150 $\mu$ L do meio de cultura líquido. Foram utilizadas quatro repetições e o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados da percentagem de nematoides mortos foram transformados em  $\arcsen\sqrt{x/100}$  e submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SAS.

Após o teste preliminar que definiu o tempo de exposição dos nematoides aos metabólitos instalou-se um bioensaio onde selecionaram-se isolados baseando-se na planta de origem, meio de cultura usado no isolamento e em características morfológicas das colônias. Foram selecionados em média 38

isolados, divergentes morfologicamente, por planta de origem. A quantificação do número de nematoides mortos foi realizada após 24 e 36 horas de exposição aos metabólitos. Depois de 36 horas os nematoides foram transferidos para água onde permaneceram por 24 horas. Adotaram-se quatro repetições por tratamento, sendo que cada teste constou de cinco tratamentos mais o controle, e o delineamento experimental foi em blocos casualizados. Os percentuais de nematoides mortos foram transformados, conforme descrito anteriormente, e submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o SAS.

#### **4. Identificação em nível de gênero**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os 10 isolados que se destacaram na avaliação *in vitro* foram submetidos à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com a extração do DNA bacteriano por meio da transferência dos isolados para microtubos contendo 200 µL de tampão de extração (0,05 M NaOH, 0,25% SDS), seguido de tratamento térmico (20 min. a 100 °C), centrifugação (1 min. a 10000 rpm equivalente a 6832 g) e coleta do sobrenadante contendo o DNA. Em seguida, foram realizadas as reações de PCR com *primers* específicos para a identificação dos gêneros *Pseudomonas* (PSM<sub>G</sub> e 9-27) (JOHNSEN et al., 1999) e *Bacillus* (B-K1/F e B-K1/R) (WU et., al 2006). Os produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, e fotografados em transluminador de UV e fotodocumentados. A análise foi realizada pela presença de banda específica para cada gênero bacteriano: *Pseudomonas* sp. (445 pb) e *Bacillus* sp. (1114 pb).

#### **5. Ensaio *in vivo***

O experimento, conduzido em casa de vegetação, constou de 22 tratamentos sendo 10 rizobactérias, 10 rizobactérias juntamente com nematoides sendo que estes foram inoculados após o período de cultivo em substrato, um controle absoluto e um apenas com nematoides, adotando-se o delineamento em blocos casualizados com 6 repetições por tratamento.

### 5.1. Preparo das suspensões bacterianas

Foram utilizados os dez isolados bacterianos que se mostraram mais promissores nos testes *in vitro*. Os isolados foram obtidos das cultivares de bananeira Prata Comum e Prata Anã e de plantas de crotalária e de cravo-de-defunto.

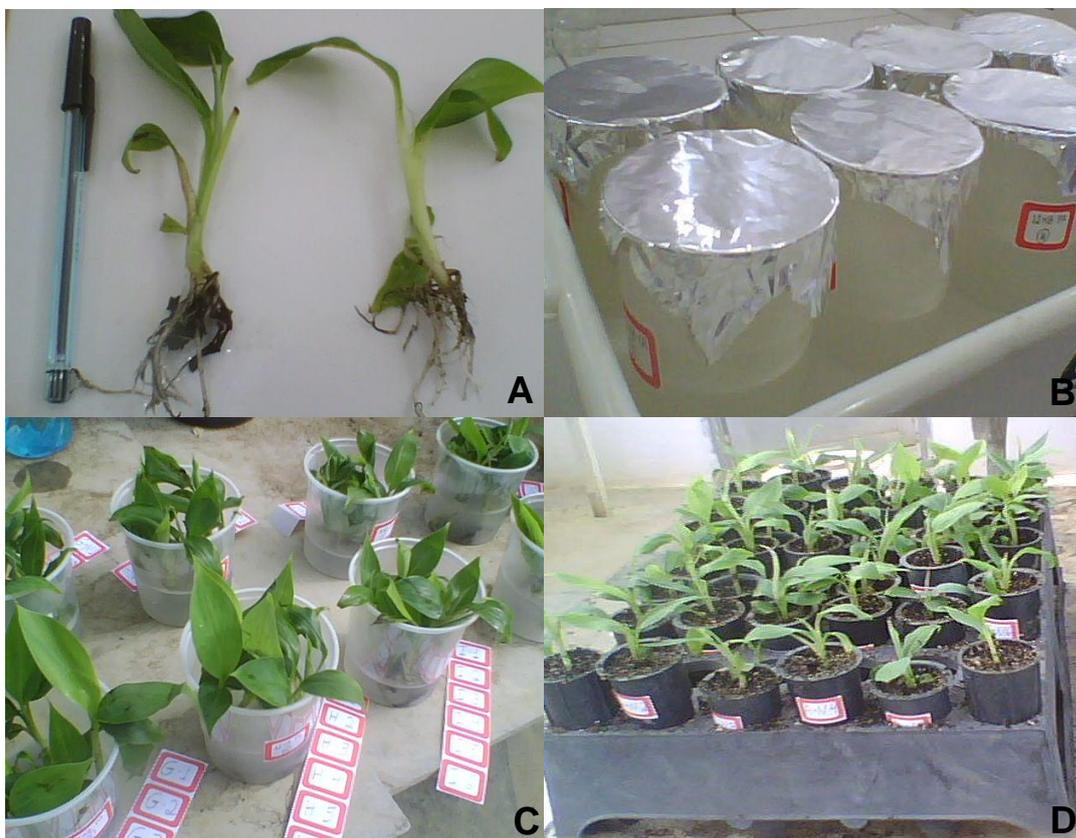
As rizobactérias foram repicadas mediante adição de 20µL do meio contendo o isolado preservado em Erlenmeyer com 50mL de meio de cultura líquido. Utilizaram-se os meios King B e TSA a depender de onde a rizobactéria foi isolada, seguido de incubação em câmara de crescimento tipo B.O.D a 28°C por 24 horas. Após este período, 100µL das culturas crescidas no meio líquido foram transferidos para os meios sólidos King B-agar e TSA contidos em placas de Petri. As suspensões foram espalhadas com alça de Drigalsky e as placas foram acondicionadas em em B.O.D a 28°C por 48 horas para o crescimento das culturas.

No preparo das suspensões bacterianas, foram adicionados 50mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri com a cultura crescida. Em seguida, realizou-se a raspagem com auxílio da alça de Drigalsky, obtendo-se, então, suspensões densas. As concentrações destas suspensões foram corrigidas para  $DO_{540} = 0,5$ , equivalente a  $10^9$  ufc/mL, em espectrofotômetro.

### 5.2. Tratamento das mudas de bananeira com rizobactérias

Foram utilizadas mudas de bananeira 'Grande Naine' micropropagadas, com 4 semanas de crescimento, cultivadas em substrato composto por uma parte de substrato vegetal Plantmax estaca: uma parte de pó de fibra de coco, adicionados de 0,2% da fórmula PG MIX e 0,2% da fórmula OSMOCOTE, produzidas na CAMPO – Companhia de Promoção Agrícola, localizada em Cruz das Almas. As mudas foram retiradas do substrato de cultivo e seus sistemas radiculares foram lavados com água destilada. Em seguida, realizou-se a imersão das raízes nas suspensões bacterianas previamente preparadas por 10 minutos. Após este período, foi feito o transplântio das mudas para tubetes, com capacidade para 300 mL, contendo substrato autoclavado composto por 50% de vermiculita e 50% de composto orgânico, sendo este último elaborado com 50%

de grama, 20% de casca de laranja, 20% de torta de cacau, 10% de torta de mamona e 30L de manipueira diluída (uma parte de manipueira para uma parte de água) (NASCIMENTO, 2010) (Figura 3).



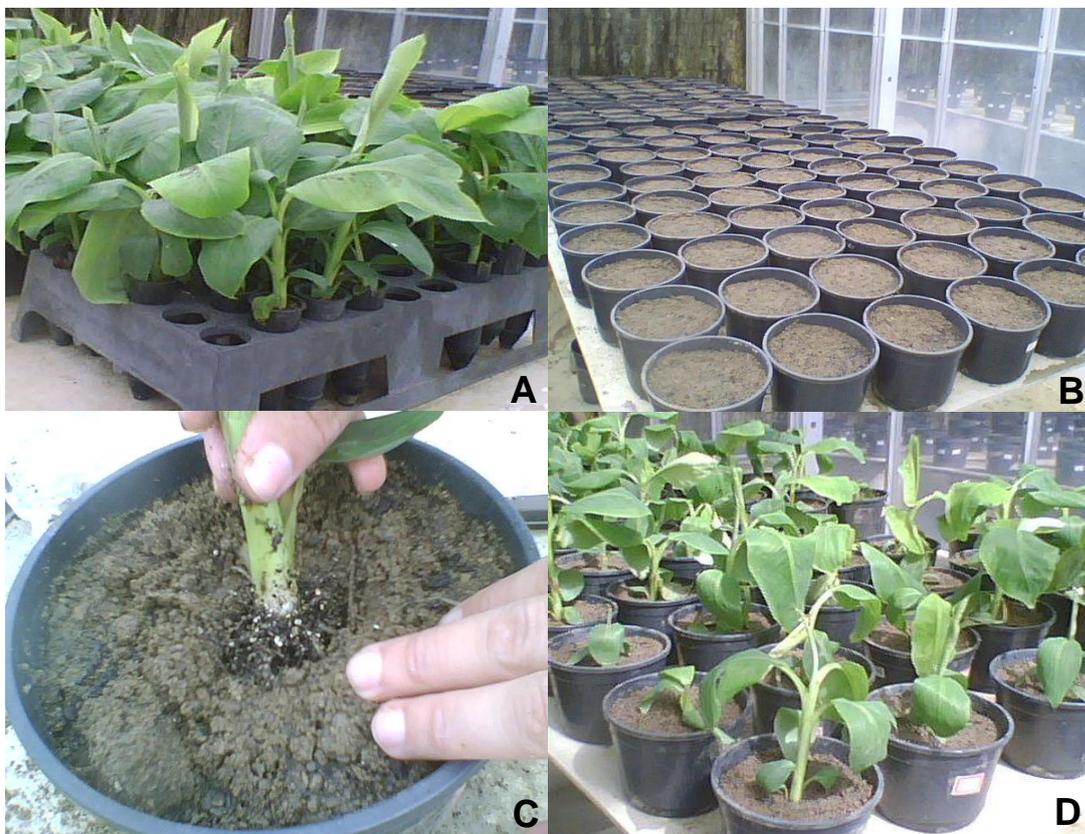
**Figura 3.** Processo de tratamento de mudas com rizobactérias e transplântio para tubetes. Aspecto das mudas utilizadas (A); suspensões bacterianas (B); inoculação das rizobactérias (C); mudas transplantadas (D).

### 5.3. Transplântio para vasos e inoculação de *Radopholus similis*

Após 45 dias de cultivo nas condições acima especificadas, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade para 2,5 dm<sup>3</sup>, contendo 2kg de substrato formado por duas partes de solo argiloso e uma parte de areia (2:1) (Figura 4). Este substrato foi primeiramente adubado com 5% do mesmo composto orgânico utilizado na composição do substrato dos tubetes e autoclavado em seguida por 1 hora. Depois de autoclavado, o solo foi submetido

à correção de pH com adição de calcário ( $0,5t\ ha^{-1}$ ), sendo posteriormente acondicionado nos vasos.

Dez dias depois do transplante, realizou-se a inoculação de 1000 espécimes de *R. similis* por muda, nos tratamentos correspondentes, com uma seringa de 5mL. A inoculação foi feita pela aplicação de 3,2mL de suspensão aquosa contendo os 1000 espécimes, em dois orifícios próximos ao pseudocaule.



**Figura 4.** Etapas do transplântio para os vasos. Aspecto das mudas após 45 dias de cultivo (A); vasos utilizados para o transplântio (B); operação de transplântio (C); vasos contendo as mudas após o transplântio (D).

#### 5.4. Avaliação do ensaio *in vivo*

O experimento foi avaliado após 60 dias de cultivo das plantas, sendo realizadas, inicialmente, as medições da altura até a inserção das folhas, com auxílio de uma régua milimetrada, e mensuração do diâmetro do caule utilizando fita métrica. Em seguida, as plantas foram cortadas na altura do coleto e a parte

aérea foi acondicionada em sacos de papel. Posteriormente, o solo foi retirado dos vasos e os rizomas foram separados, lavados e colocados em sacos de papel. A parte aérea e o rizoma foram secos em estufa a 72°C até a obtenção de massa constante. O solo e o sistema radicular foram colocados em sacos plásticos e armazenados em câmara fria para avaliação do nível de dano das raízes e quantificação do número de nematóides nas raízes e no solo.

A média das seis repetições, para cada variável de crescimento medida (altura, diâmetro, massas da parte aérea e do rizoma secos) foi considerada como valor 100 no tratamento controle e os demais calculados em relação a este. Somados os quatro valores atribuídos, o tratamento controle apresenta índice de crescimento igual a 400. A comparação entre tratamentos foi realizada pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS.

Para a avaliação do nível de dano das raízes, utilizou-se a escala proposta por Bridge & Gowen (1993), pela qual são atribuídas notas de 0 a 4 de acordo com a severidade das lesões nas raízes (Figura 5). Os dados foram submetidos ao mesmo teste e programa utilizados para o índice de crescimento.



**Figura 5.** Escala de notas do nível de dano em raízes de bananeira da cultivar Grande Naine.

Foi feita a extração e quantificação da população de *R. similis* no sistema radicular, segundo metodologia proposta por Collen & D'Herde (1972) modificada, e posterior contagem em lâmina de Peters ao microscópio óptico. A população final de *R. similis* no solo foi avaliada por meio da extração e quantificação. Para a extração dos nematoides do solo, inicialmente, realizou-se a homogeneização da amostra retirando-se 100 cm<sup>3</sup> da mesma. Em seguida, colocou-se esse volume em um recipiente plástico de aproximadamente 2L e completou-se o volume com água corrente, desagregando-se os torrões com as mãos. Posteriormente, a suspensão foi vertida em conjunto de peneiras sobrepostas de 40 mesh (superior), e 400 mesh (inferior), batendo suavemente na lateral a fim de se obter uma maior concentração de nematoides. Após esta etapa, recolheu-se a suspensão da peneira de 400 mesh, com jatos de água, obtendo-se, no final, 40 mL da mesma que foi vertida em tubos de centrifuga. Depois de se fazer o balanceamento dos tubos, procedeu-se a centrifugação por 5 minutos a uma velocidade de 3000 rpm (1814,4 g). Em seguida, descartou-se o sobrenadante, limpando-se os bordos dos tubos para retirada de impurezas e o volume destes foi completado com solução de sacarose a 50%, misturando bem com um bastão de vidro. Realizou-se novamente o balanceamento dos tubos e centrifugação por 2 minutos a 2000 rpm (806,4 g). Após a centrifugação, verteu-se o sobrenadante em peneira de 500 mesh inclinada sob torneira, retirando todo excesso de sacarose e, com jatos de água de uma pisseta, recolheram-se os nematoides em béquer com capacidade para 100 mL. Posteriormente, retirou-se 1 mL desta suspensão para contagem dos nematoides ao microscópio óptico (JENKINS & TAYLOR, 1997 modificado).

Os dados da quantificação do número de nematoides no sistema radicular e da população final de nematoides no solo foram submetidos à transformação logarítmica, sendo posteriormente analisados por meio do Teste de Scott-Knott a 5% utilizando o SAS.

## RESULTADOS

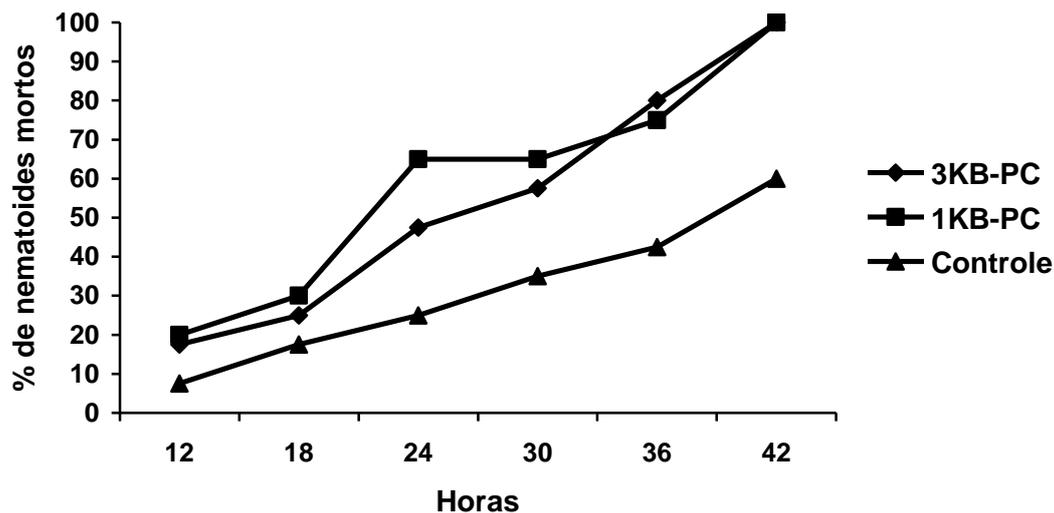
Foram obtidos 253 isolados, sendo 134 em meio King B-ágar e 119 em Tryptic Soy Agar (Tabela 1).

Na obtenção destes isolados, observou-se uma variação em função da planta de origem e do meio de cultura utilizado no isolamento, obtendo-se um maior número de isolados a partir de amostras de raízes da cultivar Prata Comum em meio TSA (40 isolados). Para a crotalária, obtiveram-se 22 isolados no mesmo meio de cultura, sendo este o menor valor registrado. Contudo, em meio King B nota-se que houve obtenção de mais isolados a partir de raízes oriundas da crotalária (40 isolados) sendo que para a bananeira ‘Prata Comum’ este número foi reduzido (28 isolados).

**Tabela 1.** Número de isolados bacterianos encontrados por meio de cultura e planta de origem

Plantas	Meio de cultura		
	King B-agar	Tryptic Soy Agar	Total
Bananeira ‘Prata Comum’	28	40	68
Bananeira ‘Prata Anã’	35	29	64
Crotalária	40	22	62
Cravo-de-defunto	31	28	59
<b>Total</b>	134	119	

A Figura 1 apresenta os resultados do teste preliminar de quantificação de nematoides mortos por suspensão de metabólitos bacterianos. As diferenças estatísticas entre os tratamentos começaram a ocorrer a partir de 24 horas de exposição dos nematoides aos metabólitos, sendo novamente observadas após 36 horas. Depois de 42 horas, 100% dos espécimes que estavam na presença de metabólitos bacterianos se encontravam mortos, mantendo-se a diferença proporcional em relação ao tratamento controle, já que neste houve também um aumento do número de indivíduos mortos.



**Figura 1.** Curvas de inativação de *Radopholus similis* em função do tempo de exposição na suspensões de metabólitos bacterianos produzidas pelos isolados 1KB-PC e 3KB-PC.

De acordo com estes dados, foi possível observar efeito dos metabólitos bacterianos sobre os nematoides após 24 e 36 horas, sendo estes os períodos mais apropriados para avaliação do potencial antagônico dos demais isolados contra *R. similis*.

Dos 152 isolados bacterianos avaliados, 64 apresentaram efeito nematicida e dentre estes, 23 apresentaram efeito tóxico ao fitonematoide após 24 e 36 horas estatisticamente significativo. Quatro tratamentos diferiram entre si nos períodos de avaliação. O isolado 17KB-CR, obtido da rizosfera de crotalária, proporcionou 100% de mortalidade após 24 horas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentagem de nematóides mortos por suspensão de metabólitos produzidos por isolados de rizobactérias após 24 e 36 horas de exposição.

Isolado	Nematóides mortos (%)		
	24 horas	36 horas	
3KB-PC	87,85 a A	87,85 a A	Prata Comum-meio KB
4KB-PC	61,78 b A	67,14 b A	
7KB-PC	65,55 b B	95,83 a A	
1KB-PC	55,67 b A	67,55 b A	
5KB-PC	61,07 b A	72,08 b A	
Controle	31,27 c A	46,07 b A	
24TSA-PC	92,26 a A	95,83 a A	Prata Comum-meio TSA
27TSA-PC	81,25 a A	93,75 a A	
16TSA-PC	80,20 a A	87,49 a A	
36TSA-PC	81,60 a A	87,50 a A	
25TSA-PC	71,11 b B	95,00 a A	
Controle	56,87 b A	58,95 b A	
5KB-PA	66,66 a A	75,00 a A	Prata Anã-meio KB
3KB-PA	68,12 a A	81,45 a A	
2KB-PA	71,66 a A	81,66 a A	
4KB-PA	63,75 a A	82,50 a A	
8KB-PA	77,49 a A	91,66 a A	
Controle	22,50 b A	31,25 b A	
31KB-PA	72,49 a A	82,77 a A	Prata Anã-meio KB
13KB-PA	57,50 b B	69,16 b A	
12KB-PA	79,44 a A	84,72 a A	
23KB-PA	70,62 a A	85,20 a A	
9KB-PA	72,57 a A	83,92 a A	
Controle	39,10 b A	55,35 b A	
19TSA-PA	87,50 a A	93,75 a A	Prata Anã-meio TSA
2TSA-PA	91,42 a A	96,42 a A	
12TSA-PA	53,86 b A	60,53 b A	
20TSA-PA	63,75 b A	80,41 a A	
3TSA-PA	83,92 a A	88,09 a A	
Controle	45,71 b A	54,87 b A	
17KB-CR	100,00 a A	100,00 a A	Crotalária-meio KB
19KB-CR	73,74 b A	79,16 b A	
18KB-CR	74,16 b A	74,16 b A	
16KB-CR	68,19 b A	83,19 b A	
Controle	47,50 b A	61,66 b A	
3TSA-CD	56,66 a A	79,16 a A	
4TSA-CD	70,08 a A	90,17 a A	
5TSA-CD	45,23 b A	55,41 b A	
6TSA-CD	71,18 a A	91,42 a A	
7TSA-CD	63,53 a B	92,85 a A	
Controle	26,82 b A	40,00 b A	

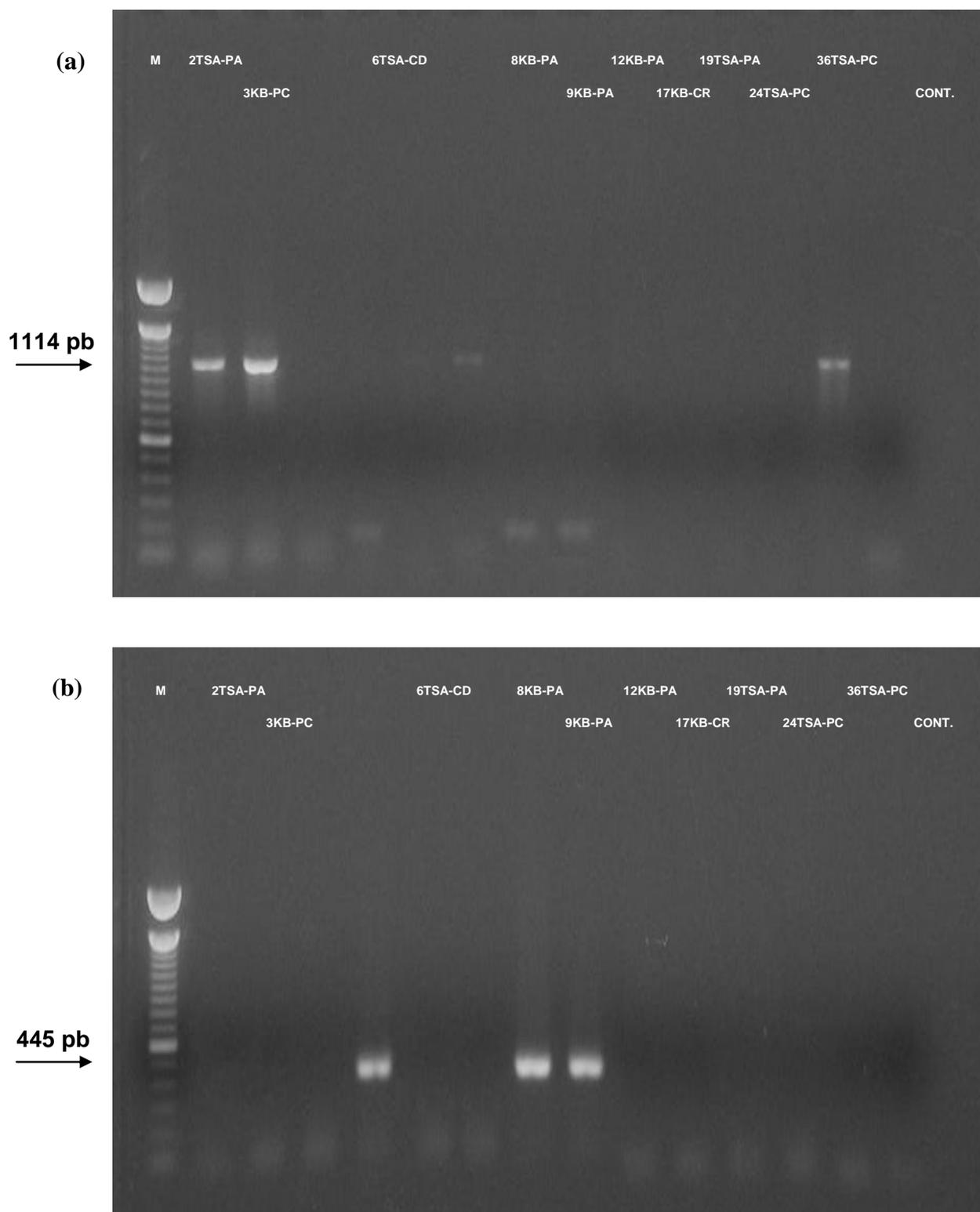
Letras minúsculas comparam os tratamentos em cada período e letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos entre os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knot a 5%.

Dos 152 isolados submetidos à avaliação *in vitro*, nota-se que maioria dos que apresentaram atividade nematicida foram obtidos em meio TSA (37 isolados). Quando se considerou a planta originária, verificou-se que 23 dos isolados promissores foram oriundos da cultivar Prata Anã, tendo sido 14 obtidos em meio King B-agar e 9 em TSA. Nove isolados proporcionaram mortalidade dos nematóides após 24 horas de exposição, sendo que este efeito não se repetiu após 36 horas. Contudo, a grande parte dos isolados (32) só apresentou efeito sobre os nematoides depois de 36 horas de exposição (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número de isolados promissores em testes *in vitro* encontrados por meio de cultura, planta de origem e período de exposição.

Plantas	Meios de cultura							
	Nº de isolados testados	King B-agar			Tryptic Soy Agar			Nº de isolados promissores
		Nº de isolados promissores	Nº de isolados testados	Nº de isolados promissores	Nº de isolados testados	Nº de isolados promissores		
		Só após 24h	Só após 36h	Ambos períodos		Só após 24h	Só após 36h	Ambos períodos
Bananeira 'Prata Comum'	20	4	0	2	20	0	6	4
Bananeira 'Prata Anã'	20	0	5	9	15	0	6	3
Crotalária	17	0	3	1	20	5	4	0
Cravo-de-defunto	20	0	3	0	20	0	5	4

Dos 10 isolados com maior efeito supressor após 24 e 36 horas, foi possível identificar cinco por meio de PCR, tendo sido três pertencentes ao gênero *Bacillus* (2TSA-PA, 3KB-PC, 36TSA-PC) e, dois, ao gênero *Pseudomonas* (8KB-PA, 9KB-PA) (Figura 2).



**Figura 2.** Perfil eletroforético dos produtos de PCR utilizando *primers* específicos para identificação bacteriana. Setas indicam as bandas características dos gêneros: a - *Bacillus* (2TSA – PA, 3KB – PC e 36TSA – PC) e; b - *Pseudomonas* (8KB – PA e 9KB – PA). M – Marcador de peso molecular (100bp).

No ensaio em condições *in vivo*, não foram detectadas diferenças estatísticas nas variáveis massas da parte aérea e do rizoma secos e índice de crescimento (Tabelas 4, 5 e Figura 3). Também não foram observadas diferenças estatísticas no nível de dano nas raízes e número de nematoides no sistema radicular (Figura 4 e Tabela 6). Porém, observou-se uma redução na população final de *R. similis* no solo, sendo que metade dos tratamentos (19TSA-PA, 8KB-PA, 12KB-PA, 9KB-PA e 17KB-PA) diferiu estatisticamente da testemunha. Dois dos cinco isolados que promoveram a redução da população de nematoides no solo pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Figura 5).

**Tabela 4.** Massa da matéria seca da parte aérea de mudas da cultivar Grande Naine tratadas com rizobactérias e inoculadas com *Radopholus similis*.

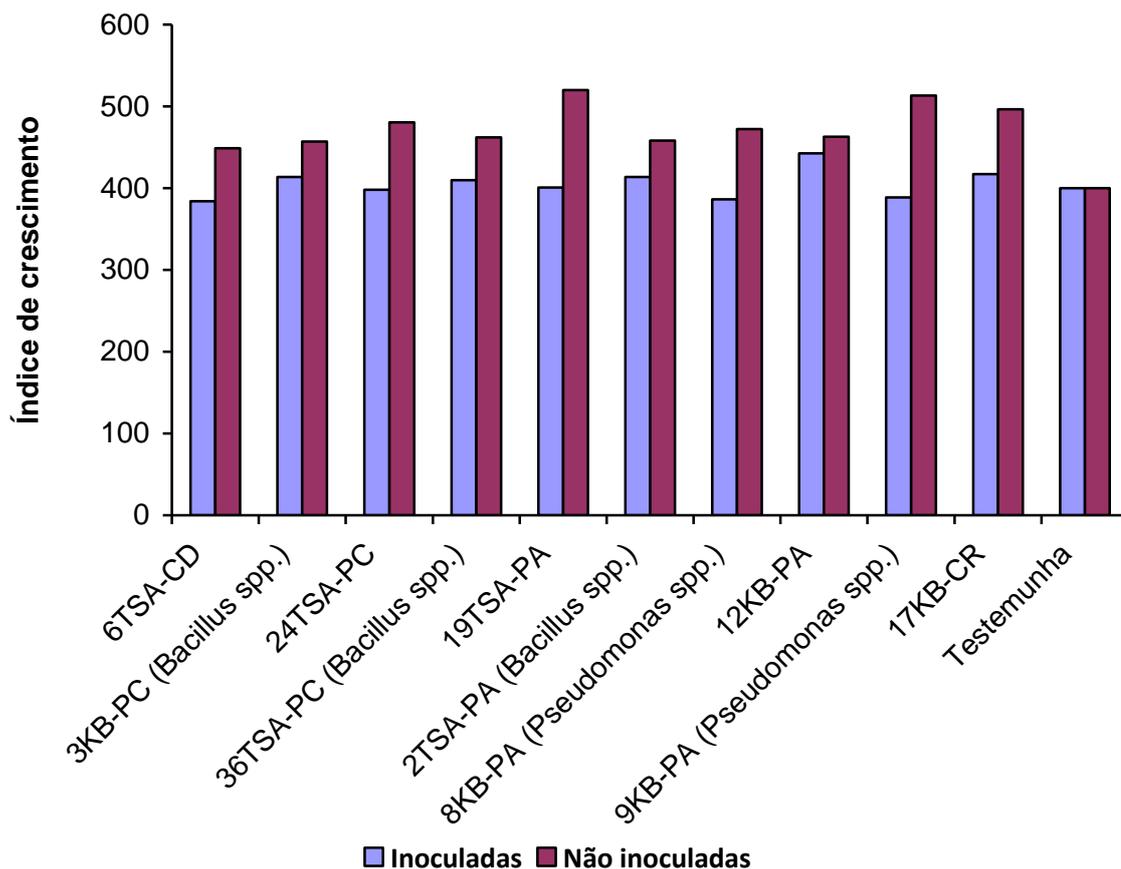
Tratamentos	Massa de matéria seca da parte aérea (g)	
	Com <i>R. similis</i>	Sem <i>R. similis</i>
6TSA-CD	8,94	8,25
3KB-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	9,41	8,36
24TSA-PC	9,11	9,46
36TSA-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	9,77	8,69
19TSA-PA	9,83	9,71
2TSA-PA ( <i>Bacillus</i> spp.)	9,73	8,91
8KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	9,91	9,45
12KB-PA	11,13	8,84
9KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	9,28	9,68
17KB-CR	10,44	8,68
Testemunha	9,45	7,70
<b>CV</b>	<b>18,05</b>	<b>20,86</b>

Não houve significância na análise de variância.

**Tabela 5.** Massa de matéria seca do rizoma de mudas da cultivar Grande Naine tratadas com rizobactérias e inoculadas com *R. similis*.

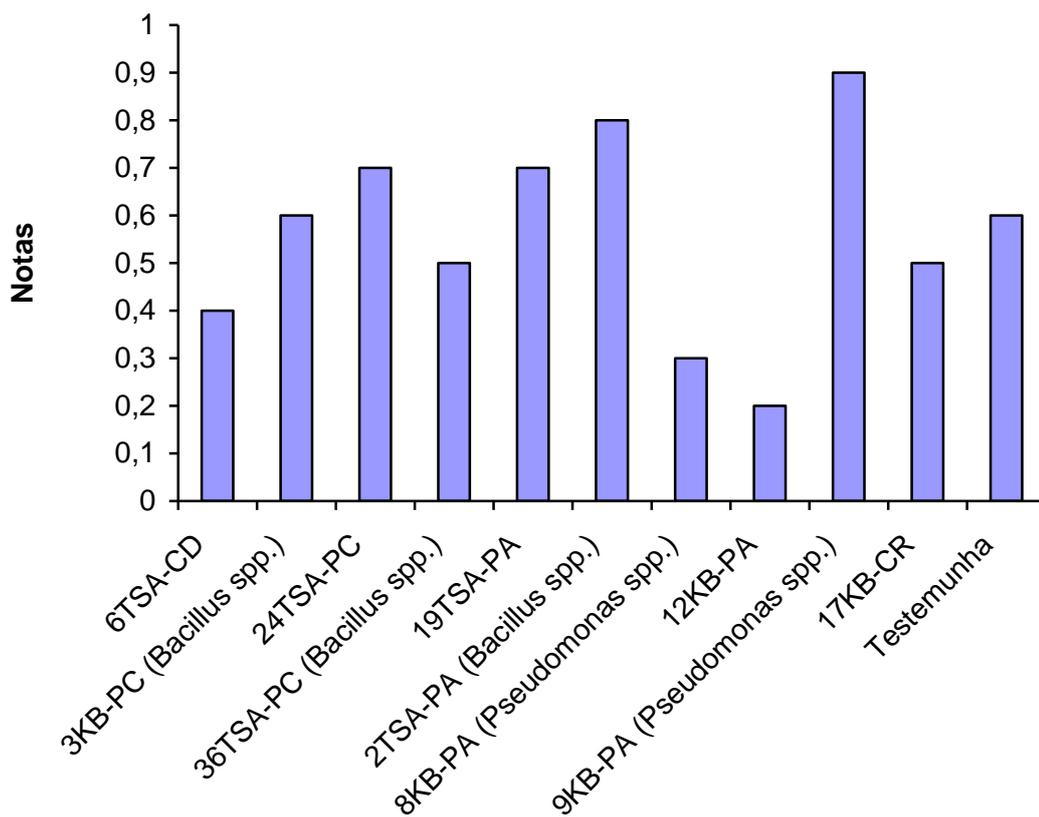
Tratamentos	Massa de matéria seca do rizoma (g)	
	Com <i>R. similis</i>	Sem <i>R. similis</i>
6TSA-CD	1,82	2,18
3KB-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	2,43	2,09
24TSA-PC	2,10	2,37
36TSA-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	2,36	2,29
19TSA-PA	2,02	2,91
2TSA-PA ( <i>Bacillus</i> spp.)	2,08	2,08
8KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	1,81	2,25
12KB-PA	2,31	2,39
9KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	1,86	2,79
17KB-CR	2,16	2,96
Testemunha	2,03	1,67
<b>CV</b>	<b>31,08</b>	<b>44,56</b>

Não houve significância na análise de variância.



**Figura 3.** Índice de crescimento de mudas da cultivar Grande Naine tratadas com rizobactérias, inoculadas e não inoculadas com *Radopholus similis*.

Não houve significância na análise de variância.



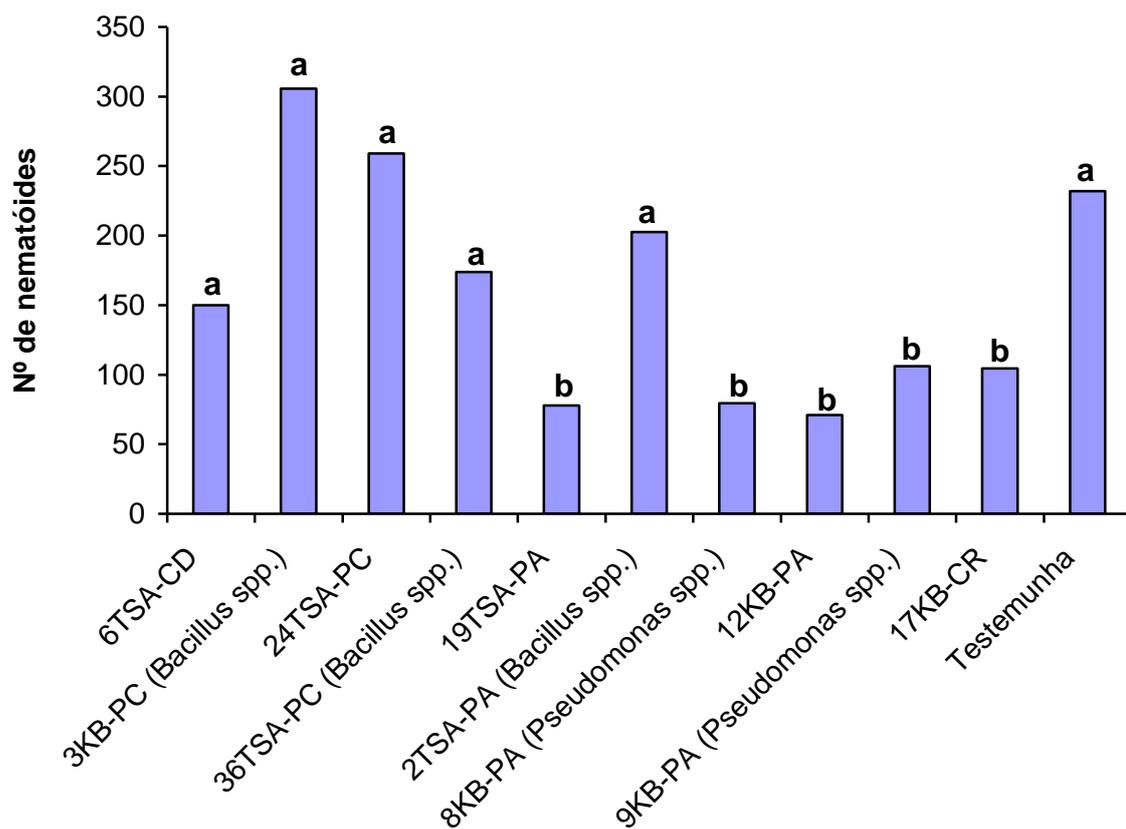
**Figura 4.** Nível de dano nas raízes de mudas da cultivar Grande Naine inoculadas com *Radopholus similis*.

Não houve significância na análise de variância.

**Tabela 6.** Quantificação do número de nematoides nas raízes.

<b>Tratamentos</b>	<b>Número de nematoides nas raízes</b>
6TSA-CD	8182.83
3KB-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	11371.20
24TSA-PC	7549.59
36TSA-PC ( <i>Bacillus</i> spp.)	9151.08
19TSA-PA	7114.35
2TSA-PA ( <i>Bacillus</i> spp.)	14200.43
8KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	5713.72
12KB-PA	5275.30
9KB-PA ( <i>Pseudomonas</i> spp.)	7517.60
17KB-CR	6901.98
Testemunha	10893.77
<b>CV</b>	<b>8,63</b>

Não houve significância na análise de variância.



**Figura 5.** Quantificação do número de nematoides no solo.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Scott-Knott a 5%.

## DISCUSSÃO

O período de exposição dos nematoides aos metabólitos influenciou diretamente a taxa de mortalidade de juvenis e adultos de *R. similis*, corroborando com os dados obtidos em outros trabalhos, inclusive com nematoides de outros gêneros. Houve aumento da mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* em todos os filtrados bacterianos testados quando se aumentou o período de exposição de 24 para 48 horas (NAVES et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados neste estudo em que o aumento do período de exposição de juvenis e adultos e de *R. similis* a metabólitos bacterianos proporcionou acréscimo no percentual de nematoides mortos. Já Coimbra & Campos (2005), trabalhando com exsudatos de actinomicetos, observaram a ocorrência de mortalidade significativa de J2 de *M. javanica* depois de 24 horas em 11 dos 41 isolados testados.

Um organismo pode interferir no desenvolvimento de outro por meio da produção de metabólitos que inibem a germinação e crescimento, ou inativam a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001). Segundo Rodríguez-Kábana (1991), existem, naturalmente no solo, bactérias capazes de produzir compostos tóxicos a fitonematoides, sendo estes compostos resultantes do metabolismo microbiano. Algumas rizobactérias, por sua vez, são capazes de produzir enzimas e metabólitos tóxicos, com ação nematicida, em condições *in vitro* (STIRLING, 1991; OKA et al., 1993). No presente trabalho, provavelmente as rizobactérias sintetizaram alguma substância antimicrobiana que causou a mortalidade de *R. similis* em condições *in vitro*. A maioria das rizobactérias (23 isolados) que se destacou nas avaliações foi oriunda de bananeira da cultivar Prata Anã. Existe, portanto, a possibilidade de a microbiota rizosférica estar relacionada à característica de moderada resistência natural apresentada pela cultivar Prata Anã a *R. similis* (EMBRAPA, 2009), o que explicaria os resultados encontrados.

Dos 152 isolados avaliados nos testes de biocontrole *in vitro*, 37 foram obtidos da rizosfera de crotalária e 40 de cravo-de-defunto (Tabela 3), espécies de conhecido antagonismo a nematoides. Dentre estes, vinte e cinco, sendo 13 obtidos da rizosfera de crotalária e 12, da rizosfera de cravo-de-defunto, mostraram efeito tóxico sobre *R. similis* nas avaliações *in vitro*. Os percentuais de nematoides mortos variaram de 55,2 a 100%, indicando que a microbiota das

plantas antagonistas a nematoides apresenta potenciais agentes de biocontrole destes fitopatógenos. Fabry (2002) também encontrou dois isolados bacterianos oriundos de combinações de solo submetidos e não submetidos a tratamento térmico com homogeneizado de espécies antagonistas a nematoides capazes de inibir a eclosão de J2 de *M. javanica* em condições *in vitro*.

Diversos gêneros e espécies compõem o grupo de PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) que atuam por controle biológico, tendo destaque os isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente, *Bacillus* e *Streptomyces* (SILVEIRA, 2001). Neste trabalho, foi possível identificar bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* com potencial de biocontrole em condições *in vitro*, indicando que estas bactérias podem ser pertencentes ao grupo das PGPR que agem por meio do biocontrole. De acordo com Romeiro & Garcia (2009), certas bactérias benéficas como as rizobactérias, quando dispensadas em plantas são capazes de promover o controle biológico de enfermidades por antagonismo direto, por indução de resistência ou por ambos os mecanismos. Entre as mais comuns e que atuam de forma efetiva, estão as bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*. Isolados de *B. subtilis* e de *Pseudomonas* spp. oriundos do solo, além de serem antagonistas a bactérias e fungos fitopatogênicos, também têm potencial como agentes de controle biológico de nematoides (KERRY, 2000). Dentre os mecanismos de supressão desempenhados pelas rizobactérias contra nematoides destacam-se a produção de antibióticos e a indução de resistência sistêmica. A ocorrência de resistência sistêmica na planta tratada com rizobactérias é detectada pelo acúmulo de quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases, peroxidases, fitoalexinas e formação de biopolímeros.

Neste estudo, observou-se a ocorrência de mortalidade de *R. similis* quando em contato com metabólitos bacterianos produzidos por isolados de *Bacillus* e de *Pseudomonas* em condições *in vitro*. Este efeito sobre os nematoides demonstra que estas bactérias são capazes de sintetizar determinados compostos que podem atuar como nematicidas.

Pesquisas demonstraram que determinadas bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de sintetizar duas substâncias denominadas beta-exotoxina e delta-endotoxina. A beta-exotoxina, que pode apresentar efeito nematicida e nematostático sobre *M. incognita* e *Heterodera glycines*, é um produto extracelular

solúvel em água e termoestável a 120°C por 15 minutos (FAUST & LEE, 1982; LESKHOVA, 1986; NOEL, 1990). Existem relatos sobre formulações comerciais compostas apenas por delta-endotoxinas, produzidas por *B. israelensis* e *B. thuringiensis*, que apresentaram bons resultados no biocontrole de fitonematoides (MEADOWS et al. 1990; SHARMA, 1994). Apesar de a delta-endotoxina ser considerada a fração mais importante da atividade nematicida na maioria dos estudos, ainda não foi confirmado qual o papel desempenhado por este metabólito (NARVA et al. 1991; LEYNS et al., 1995).

Siddiqui & Shaukat (2003) observaram em seus estudos que o composto 2,4 – diacetylpholoroglucinol, produzido por *P. fluorescens*, reduziu a eclosão de J2 de *M. javanica*. Já Hamdan et al. (1991) constataram que *P. putida* e *P. fluorescens* têm a capacidade de sintetizar alguns antibióticos que causam a morte de micro-organismos.

Em condições de cultivo *in vivo*, diferentemente das condições de laboratório, sendo estas mais facilmente controladas, existe uma série de fatores que tem influência direta no estabelecimento e atuação dos agentes de biocontrole, incluindo as rizobactérias. Variações nas condições de cultivo como o tipo de solo, temperatura, irrigação, além da própria planta, podem favorecer ou minimizar a ação das rizobactérias sobre fitopatógenos proporcionando ou não um melhor desenvolvimento da planta.

Cinco dos dez isolados selecionados nas avaliações *in vitro* reduziram a população final de nematoides no solo em condições *in vivo*. Neste experimento, observou-se que as condições do solo favoreceram a multiplicação das rizobactérias, permitindo, assim, a ação destes micro-organismos sobre *R. similis*. Estas observações mostraram que as rizobactérias são altamente influenciadas pelas condições do solo, conforme já havia sido observado por Freitas (2009).

Dentre os tratamentos que proporcionaram redução na população final de *R. similis* no solo, dois foram compostos por isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Esta diminuição provavelmente ocorreu devido ao favorecimento à multiplicação destas bactérias, uma vez que as espécies deste gênero são capazes de se adaptar bem na rizosfera, levando ao desencadeamento dos mecanismos de ação característicos do gênero. O antagonismo direto, pela produção de antibióticos ou por competição por nutrientes essenciais, tais como o ferro, é um dos mecanismos utilizados pelas

espécies de *Pseudomonas* para biocontrolar fitonematoides no solo (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; MELO, 2010). A espécie *P. fluorescens* se caracteriza por ser capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, além de competir com a microflora nativa, apresentando grande agressividade na colonização da rizosfera (STIRLING, 1991; MAZZOLA et al., 1992).

A busca por rizobactérias em plantas reconhecidamente antagonistas aos nematoides de culturas comerciais pode aumentar, em até seis vezes, as chances de se encontrar bons agentes em testes *in vivo* (KLOEPFER et al., 1991; 1992). Observou-se neste estudo que o isolado 17KB-CR, obtido de crotalária, além de apresentar efeito de biocontrole *in vitro*, também demonstrou capacidade de atuar sobre os nematoides no solo em condições *in vivo*.

Nenhum dos isolados avaliados em condições *in vivo* foi capaz de reduzir a penetração de *R. similis* no sistema radicular das plantas. Provavelmente, as rizobactérias utilizadas neste experimento não desencadearam mecanismos de interferência na relação patógeno-hospedeiro, permitindo, assim, que houvesse penetração nas raízes. Segundo Siddiqui & Mahmood (1999), dois mecanismos de ação podem ser responsáveis pela redução na taxa de infecção da raiz: (i) produção de metabólitos que reduzem a comunicação entre a planta hospedeira e o nematoide e (ii) degradação de exsudatos provenientes da raiz que controlam o comportamento do fitonematoide. O efeito de rizobactérias não-parasitas em reduzir ou impedir a penetração de fitonematoides, possivelmente, seja devido a uma ligação entre a bactéria e lectinas na superfície da raiz. Por este mecanismo, o processo de reconhecimento é controlado por interações entre lectinas na superfície da raiz e os carboidratos na cutícula do nematoide (ZUCKERMAN, 1983; FILHO & MINHONI 2007).

## CONCLUSÕES

Do total de 152 isolados testados, 64 mostraram efeito nematicida *in vitro*, sendo que a planta de origem do isolado foi fator importante para o resultado obtido.

Maior número de isolados bacterianos com efeito nematicida foi obtido da bananeira 'Prata Anã'.

Em torno de 15% das rizobactérias avaliadas neste estudo apresentam potencial biocontrolador de *R. similis* em condições *in vitro* após 24 e 36 horas de exposição.

Em condições *in vivo*, os isolados não promoveram o mesmo efeito de biocontrole e não interferiram no nível de dano, mas tiveram impacto no número de nematoides no solo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se nesta pesquisa que rizobactérias isoladas de cultivares de bananeira moderadamente resistentes a *R. similis* e espécies antagonicas a nematóides apresentaram potencial de biocontrole deste nematoide em condições *in vitro*. Porém, estudos futuros são necessários para identificar os metabólitos produzidos pelas rizobactérias e para descobrir quais destes metabólitos estariam relacionados ao efeito tóxico sobre o nematoide. Com isso, haveria a possibilidade de se realizar a multiplicação massal das rizobactérias e extração dos metabólitos específicos, responsáveis pela toxidez, podendo, posteriormente, utilizá-los em outros experimentos para avaliar o efeito destes metabólitos em mudas de bananeira suscetíveis a *R. similis*.

Grande parte das rizobactérias promissoras nos testes de antagonismo *in vitro* foram obtidas da rizosfera de bananeiras 'Prata Anã', que é moderadamente resistente a *R. similis*. Estudos direcionados à relação entre a microbiota rizosférica e a resistência apresentada por variedades comerciais de bananeira poderão ser realizados, buscando esclarecer se existe ou não alguma interação rizobactéria-plantas que proporcione condições para o desencadeamento dos mecanismos de resistência apresentados pelo hospedeiro.

Algumas rizobactérias selecionadas nos testes *in vitro* foram capazes de reduzir a população do *R. similis* no solo. Estes resultados abrem novos caminhos para pesquisas em controle biológico de *R. similis* no sentido de elucidar quais mecanismos estariam envolvidos na supressão dos espécimes nesta condição, intencionando um melhor entendimento das relações entre as rizobactérias, o nematoide e o hospedeiro, para que haja, no futuro, a possibilidade de desenvolvimento de produtos biológicos capazes de exercer o controle dos fitonematoides em condições de campo.

## REFERÊNCIAS

AALTEN, P. M.; VITOUR, D.; BLANVILLAIN, D.; 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.

ARAÚJO, F. F. & MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1558-1561, 2009

ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARÁUJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 32, n. 2, p.197-202, 2002.

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

BERG, G. & HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In: Schulz, B.; Boyle, C.; Sieber, T. (Eds.). **Microbial root endophytes**. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. Soil Biology, v. 9, p. 53-69, 2006.

BORGES A. L. & SOUZA L. S. Exigências edafoclimáticas. **O cultivo da bananeira**. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

BRIDGE, J. & R. GOWEN. Visual assessment of plant parasitic nematode and weevil damage on bananas and plantain. p. 147-154, 1993.

BROOKS, T. L. & PERRY, V. G. Apparent parthenogenetic reproduction of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. **Soil Crop Science of the Society of Floride**, v. 22, p. 160-162, 1962.

CARVALHO, J. C. **O nematóide cavernícola e seu aparecimento em São Paulo**. *Biológico*, v. 25, p. 195-198, 1959.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de Fisiologia Vegetal: fisiologia dos cultivos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008. 864p.

CHARLES, J. S. K. Effect of intercropping antagonistic crops against nematodes in banana. **Annals of Plant Protection Sciences**, v. 3, n. 2, p. 185-187, 1995.

CHAVES, N. P.; POCASANGRE, L. E.; ELANGO, F.; ROSALES, F. E.; SIKORA, R. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 122 p. 472–478, 2009.

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

COLLEN, N. W. & D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agricultural Research Centre**, Belgium, 1972.

CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* sp.). In: Kimati, H.; Amorim, I.; Bergamin Filho, A.; Camargo, I. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 215-222, 2005.

COSTA, D. C. **Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil**. (Tese-Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

COSTA, D. C. & CORDEIRO, Z. J. M. **Nematóides**. Disponível em: <[http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_2324.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2324.pdf)>. Acessado em: 11 de junho de 2009.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; ZOOCA, R. J. F.; PODESTÁ, G. S.; CAIXETA, L. B.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A. Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 1, p. 18-22, 2010.

DAVIDE, R. G. Overview of nematodes as limiting factor in Musa production. In: Frison, E.A.; Horry, J.P.; De Waele, D. (Eds.). **New frontiers in resistance breeding for nematode, fusarium and sigatoka**. Montpellier: Inibap, p. 27-31, 1996.

DEMUNER A. J.; LONGUE, F. M.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS M. A. Síntese e avaliação da atividade nematocida derivados da piperazina. **Eclética Química**. São Paulo, v. 26, p.11-24, 2001.

EMBRAPA Semiárido. Sistemas de produção de bananeira irrigada. Versão eletrônica. 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/doencas.htm#nematoses>>. Acessado em: 18 de agosto de 2010.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, FR) 2006. Distribution maps of quarantine pests for Europe (en línea). Disponível em: <[http://www.eppo.org/QUARANTINE/nematodes/Radopholus\\_similis/RADOSI\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/nematodes/Radopholus_similis/RADOSI_map.htm)>. Acessado em 23 de novembro de 2010.

FABRY, C. F. S. **Controle de *Meloidogyne javanica* por rizobactérias de plantas antagonistas a fitonematóides**. (Tese-Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2002.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations. Agricultural Database. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>. Acesso em 20 de dezembro de 2010.

FAUST, R. M. & LEE, A. B. **Bacterial and Their Toxins As Insecticides in Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker, v. 3, p. 75-206, 1982.

FERNÁNDEZ, E.; MENA, J.; GONZÁLEZ, J.; MÁRQUEZ M. E. Biological control of nematodes in banana. In: Turner D. W. & Rosales F. E. (Eds.). **Banana root system: towards a better understanding for its productive management**. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 193-200.

FERRAZ, S. & FREITAS, L. G. **O controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>>. Acessado em 9 de junho de 2009.

FILHO, J. A. C. & MINHONI, M. T. A. Interações microbianas e controle de fitopatógenos na rizosfera. In: Silveira, A. P. D. & Freitas, S.S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Instituto Agronômico, Campinas-SP, p. 239-258, 2007.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acessado em 25 de junho de 2009.

FREITAS, L. G.; GIARETTA, R. D.; ZOOCA, R. J. F.; PODESTÁ, G. S.; FERRAZ, S. **Controle biológico de nematóides: estudo de casos**. Disponível em: <[http://www.rizoflora.com.br/arquivos\\_internos/arquivos/manejo\\_integrado.pdf](http://www.rizoflora.com.br/arquivos_internos/arquivos/manejo_integrado.pdf)>. Acessado em 22 de junho de 2010.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; FABRY, C. F. S.; MARRA, B. M.; COUTINHO, M. M.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 215-220, 2005.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas. In: Silveira, A. P. D. & Freitas S. S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Instituto Agrônômico, Campinas-SP, p. 1-20, 2007.

GOWEN, S. & QUÉNÉHERVÉ, P. Nematodes parasites of bananas, plantains and abaca. In: Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical e tropical agriculture**. Wallingford, Oxon, UK. CAB International, p. 431-460, 1990.

HABE, H. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP – no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. (Tese-Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

HAMDAN, H.; WELLER D. M.; THOMASHOW L. S. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3270-3277, 1991.

HANDELSMANN, J. & STABB E. V. Biocontrol of soilborne pathogens. **Plant Cell**, v. 8, p.1855-1869, 1996.

HASS, D. & DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 307-319, 2005.

HUETTEL, R. N & DICKSON, D. W. Karyology and oogenesis of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. **Journal of Nematology**, v.13, p. 16-19, 1981.

IBGE, 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola - LSPA, novembro de 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

IIZUKA, H.; KOMAGATA; T., KUNII, Y.; SHIBUYA, M. Nematocidal action of microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 26, p. 199, 1962. (Abstract).

JENKINS, W. R. & TAYLOR, D. P. **Plant Nematology**. 3.ed. Sao Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997.

JOHNSEN, K.; ENGER, O.; JACOBSEN, C.S.; THIRUP, L.; TORSVIK, V. Quantitative Selective PCR of 16S Ribosomal DNA Correlates Well with Selective Aga Plating in Describing Population Dynamics of Indigenous *Pseudomonas* spp. in Soil Hot Spots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1786-1789, 1999.

KEREN-ZUR, M.; ANTONOV, J; BERCOVITZ, A.; FELDMAN, K.; HUSID, A.; KENAN, G.; MARKOV N, REBHUN, M. *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes. **Proceeding of Brighton crop protection conference on pests and diseases**, v. 2A, p. 47–52, 2000.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 38, p. 423–441, 2000.

KIMAT, H.; AMORIM, L.; REZENDE, M. A. J.; BERGAMIN FILHO, A. B.; CAMARGO, A. E. L. Doenças das plantas cultivadas. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 112-114, 2005.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J. A.; COLLINS, D. J. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in the rhizosphere of plant with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, v.136, n. 1, p. 95-102, 1991.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; McINROY, J.A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v. 139, p. 75-84, 1992.

KLOEPPER, J. W & RYU, C. M. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. (Eds.). **Microbial root endophytes**. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. Soil Biology, v. 9, p. 53-69, 2006.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, p. 1259-1266, 2004.

KLUEPFEL, D. A.; MCINNIS T. M.; ZEHR E. I. Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soil suppressive of the nematode *Criconemella xenoplax*. **Phytopathology**, v. 83, p. 1240-1245, 1993.

KUBO, R. K.; OLIVEIRA, C. M. G.; MACHADO, A. C. Z; INOMOTO M. M. **Nematóides fitoparasitas da bananeira**. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIII%20RIFIB/kubo.pdf>>. Acessado em: 23 de agosto de 2009.

LESKHOVA, A. Condiciones para la formación de la beta exotoxina por cepas de *B. thuringiensis*. Pat. Tr., v. 83, p. 422, 1986.

LEYNS, F.; BORGONIE, G.; ARNAUT, G.; WAELE, D. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 18, n. 3, p. 211- 218, 1995.

LOEFFLER, W.; TSCHEN, S. M.; VAMITTANAKOON, N.; KUGLER, M.; KNORPP, E.; HSIEH, T. F.; WU, T. G. Antifungal effects of Bacilysin and

Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. **Journal of Phytopathology**, v. 115, p. 204-213, 1986.

LOOS, C. A. Studies on the life-history and habits of the burrowing nematode *Radopholus similis* the cause of black-head disease of banana. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 29, p.3-52, 1962.

LOPER, J. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. **Phytopathology**, v. 78, p. 166-172, 1988.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C.; VASCONCELOS, E. C. **Levantamento fitopatológico de doenças da bananeira com ênfase à sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) nos municípios produtores de banana da Paraíba.** 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_2/Sigatoka/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/Sigatoka/index.htm)>. Acessado em: 20/01/2011.

MADIGAN M. M., MARTINKO J., PARKER J. E. **Brock biology of microorganismo.** New York, Prentice Hall, 2003, 1.104p.

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

MAZZOLA, M.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; PIERSON, L. S. Contribution of Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2616-2624, 1992.

MCCLURE, M. **Damages on banana “corm” - burrowing nematode *Radopholus similis*** (Cobb, 1893) Thorne, 1949. University of Arizona, United States, 2005. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356102>>. Acessado em 4 de maio de 2010.

MCCLURE, M. Damages on banana roots - **burrowing nematode *Radopholus similis*** (Cobb, 1893) Thorne, 1949. University of Arizona, United States, 2005. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356101>>. Acessado em 4 de maio de 2010.

MEADOWS, J. S.; GILL, S. S.; BONE, L. W. *Bacillus thuringiensis* Affects Population Growth of the Free Living Nematode *Torbatrrix aceti*. **Invert. Reprod. and Devel.**, v. 17, p. 73-76, 1990.

MELO, I. S. **Rizobactérias**. Agência de Informação Embrapa Agricultura e Meio Ambiente. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_53\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_53_210200792814.html)>. Acesso em: 9 de agosto de 2010.

MENA, J.; PIMENTEL, E.; VELOZ, L.; HERNÁNDEZ, A. T.; LEÓN, L.; RAMÍREZ, Y.; SÁNCHEZ, I.; MENCHO, J. D.; LÓPEZ, A.; PUJOL, M.; BORROTO, C.; RAMOS, E.; ALVAREZ, J. M.; MARÍN, M.; JIMÉNEZ, G.; GARCÍA, G.; PICO, V. M.; EXPÓSITO, M.; COCA, Y.; GÓMEZ, M.; OLAZABAL, A.; HERNÁNDEZ, A.; FALCÓN, V.; DE LA ROSA, M.; MENÉNDEZ, I.; RAÍCES, M. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. **Biotechnologia Aplicada**, v. 20, n. 4, p. 248-252, 2003.

MENDEZ, N. P. C. **Utilización de bacterias y hongos endofíticos para El control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb)**

**Thorn.** (Tese – Mestrado). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica 2007.

MENDOZA, A. R.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. *In vitro* activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematodes *Radopholus similis*, the root knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 377-389, 2008.

MENDONZA, A. R. & SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, v. 54, p. 263–272, 2009.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Manejo integrado de doenças radiculares. In: Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. (Eds.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife, PE, UFRPE, p. 367-388, 2005.

MOREIRA, R. S. **Banana: Teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargill, 1999. CD-ROM.

NASCIMENTO, L. M. **Produção orgânica de mudas de fruteiras inoculadas com fungos micorrízicos**. (Tese-Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 2010.

NARVA, K. E.; PAYNE, J.; SCHWAB, J.; HICKLE, G. E.; GALISON, L. A.; SICK, A. J. Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis*. **European Patent Application 91305047.2**, 1991.

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.

Nemapix Archive. **Uprooting of banana resulting from roots destroyed by *Radopholus similis***. United States, 2005. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356117>>. Acessado em 4 de maio de 2010.

NOEL, G. R. Evaluation of thuringiensin of *H. glycines* on Soybean. **Suppl. J. Nematology**, v. 22, n. 4, p. 763-766, 1990.

O'BANNON, J. H. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. **Journal of Nematology**, v. 9, n. 1, p. 16-25, 1977.

OKA, Y. et al. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, v.3, p.115-126, 1993.

OOSTENDORP, M. & SIKORA, R. A. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Review Nematology**, v. 14, p. 269-274, 1990.

OOSTENDORP, M. & SIKORA R. A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, v. 12, n. 1, p. 77-83, 1989.

PINOCHET, J. A note on nematode control practice on bananas in Central América. **Nematropica**, v. 16, n. 2, p. 197-203, 1986.

PINOCHET, J. Comments on the difficult in breeding bananas and plantations for resistance to nematodes. **Revue Nématologie** v. 11, p. 3-5, 1988.

RITZINGER, C. H. S. P. & COSTA D. C. Nematóides e alternativas de manejo. **O cultivo da bananeira**. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

RITZINGER, C. H. S. P. & FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v. 28, n. 2, p. 331-338, 2006.

RIVAS, X. & ROMAN, J. Investigations on the host range of a population of *Radopholus similis* from Puerto Rico. **Nematropica**, v. 15, p. 165-170, 1985.

RODRÍGEZ-KÁBANA, R. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. **Nematropica**, v. 21, p. 111-122, 1991.

ROMEIRO, R. S. & GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: Bettiol, W. & Morandi, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, p. 85-99, 2009.

ROSSI, C. E. **Nematóides da bananeira**. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/VI\\_RIFIB/rossi.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/VI_RIFIB/rossi.pdf)>. Acessado em: 2 de abril de 2009.

SALES, JR., R.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M.; RODRIGUES, V. J. L. B. Controle químico de doenças radiculares. In: Michereff, S.J.; Andrade D. E. G. T.; Menezes M (Eds.) **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife-PE. UFRPE, p. 367-388, 2005.

SARAH, J. L.; PINOCHET, J.; STANTON, J. **The Burrowing Nematode of Bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913**. *Musa* Pest Fact Sheet, Montpellier: International Network for Improvement of Banana and Plantain, n. 1, 1996, 2p.

SCHAAD, N. W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul. **American Phytopathological Society**, 1988, 164p.

SHARMA, R. V. *Bacillus thuringiensis*: A Biocontrol Agent of *Meloidogyne incognita* on Barley. **Nematologia Brasileira**, v. 18, p. 79-84, 1994.

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

SIDDIQUI, I. A. & SHAUKAT, S. S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1615-1623, 2003.

SIKORA, R. A. & HOFFMANN-HERGATEN, S. Importance of plant health-promoting rhizobacteria for the control of soil-borne fungal diseases and plant parasitic nematodes. **Arabian Journal of Plant Protection**, v. 10, n. 1, p. 53-48, 1992.

SIKORA, R. A.; RACKE, J.; BODENSTEIN, F. Influence of plant health promotion rhizobacteria antagonistic to *Globodera pallida* and *Heterodera schachii* on soil borne fungal and bacteria plant pathogens of potato and sugarbeet. **Journal of Nematology**, v.21, p. 588, 1989.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. S. Bananeira. In: Bruckner C. H. (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa-MG. UFV, p.101-157, 2002.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. Variedades. **O cultivo da bananeira**. (Eds. A. L. Borges & L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. In: Michereff S.J. & Barros, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife-PE. UFRPE. p. 71-100, 2001.

SIMMONDS, N. W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume. 1973, 539p.

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

STOLF, E. C.; POCASANGRE, L. E.; GUERRA, M. P. Efeito de ré-inoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematóide cavernícola da bananeira (*Radopholus similis*). **XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical**. Joinville - Santa Catarina, 2006.

STOVER, R. H. & BUDDENHAGEN, I. W. Banana breeding: polyploidy, disease, resistance and productivity. **Fruits**, v. 41, p. 175-191, 1986.

THOMASHOW, L. S. & WELLER, D. M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey, G. & Keen, N. T. (Eds.). **Plant-Microbe Interactions**. New York, Chapman and Hall, v. 1, p. 187-236, 1996.

THORNE, G. **Principles of Nematology**. New York: McGraw-Hill, 1961, 553p.

TIHOHOD, D. **Guia prático para a Identificação de Fitonematóides**. Jaboticabal: FCAV, FAPESP, 1997. 246p.

VAN WEERDT, L. G. Studies on the biology of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949. In: **II Embriology and post-embryonic development**. Nematologica, v. 5, p. 43-51, 1960.

VILAS BOAS, L. C.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S. P.; ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa spp.*) ao nematóide *Meloidogyne incógnita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 690-693, 2002.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.

WELLER, D. M. & COOKE, R. J. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, v. 73, p. 463-469, 1983.

WU, X.; WALKER, M.J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of microbiological methods**, v.64, p.107-119, 2006.

ZEM, A. C.; & ALVES, E. J. Observações sobre perdas provocadas por nematóides em bananeira (*Musa acuminata*) cultivar Nanicão. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 10p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa, 6), 1981.

ZUCKERMAN, B. M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. **Journal of Nematology**, v. 15, p. 173-183, 1983.