

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
MARCIELLY FLECK TURATTO

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Pseudomonas* DO GRUPO
FLUORESCENTE ISOLADA NO PLANALTO CATARINENSE NO
CONTROLE DE *Ditylenchus* spp. E *Meloidogyne javanica***

Curitibanos
2015

MARCIELLY FLECK TURATTO

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Pseudomonas* DO GRUPO
FLUORESCENTE ISOLADA NO PLANALTO CATARINENSE
NO CONTROLE DE *Ditylenchus* spp. E *Meloidogyne javanica*.**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado
ao Curso de Agronomia, do Campus
Curitibanos da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr. Glória Regina
Botelho

Curitibanos
2015

Turatto, Marcielly Fleck Turatto
POTENCIAL ANTAGÔNICO DE Pseudomonas DO GRUPO
FLUORESCENTE ISOLADA NO PLANALTO CATARINENSE NO CONTROLE
DE Ditylenchus spp. E Meloidogyne javanica / Marcielly
Fleck Turatto Turatto ; orientadora, Glória Regina Botelho
Botelho - Curitiba, SC, 2015.
25 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Controle biológico. 3. Pseudomonas
spp. 4. Ditylenchus spp. 5. Meloidogyne javanica. I.
Botelho, Glória Regina Botelho. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

MARCIELLY FLECK TURATTO

Potencial antagônico de *Pseudomonas* do grupo fluorescente isolada no planalto catarinense no controle de *Ditylenchus* spp. E *Meloidogyne javanica*.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a):

Data da defesa:

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Glória Regina Botelho
Titulação: Dra. Em Ciências
Área de concentração em Biotecnologia vegetal
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Adriana T. Itako
Titulação Doutorado
Área de concentração em Fitopatologia
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Cláudia G. Piva
Titulação M Sc
Área de concentração em Produção vegetal
Instituição UNOESC

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Marines e minha irmã Michele, por serem fontes de inspiração e pelo apoio nessa jornada.

Ao meu namorado Jardel Finger, por estar sempre do meu lado apesar da distância.

As minhas amigas de faculdade, e agora para toda a vida Sibila Grigolo, Renata Moraes, Camila Castilhos, e Gabrieli Ferreira.

A minha amiga de sempre Michele Nogueira, por estar sempre me apoiando.

Aos meus amigos Kevim Muniz e Jonas Vargas, pelas jornadas exaustivas de estudos.

A minha orientadora Dr^a Glória Regina Botelho, pela orientação, paciência e dedicação.

A minha parceira de laboratório Mariane Carvalho e técnicos.

A minha família.

A Deus por me dar forças e capacidade para superar todos os obstáculos que a vida nos proporciona.

E ao meu pai, que mesmo não presente fisicamente na Terra, se fez presente espiritualmente em todos os momentos.

Meu muito obrigada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Escala de notas para avaliação de infecção de <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
Tabela 2 Média do número de ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> eclodidos em câmaras de eclosão durante nove dias sobre ação de diferentes isolados de <i>Pseudomonas</i> do grupo fluorescente	17
Tabela 3 Número de juvenis de diferentes estádios de <i>Ditylenchus</i> spp. recuperados em câmaras com papel filtro durante nove dias sobre ação de diferentes isolados de <i>Pseudomonas</i> do grupo fluorescente.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Câmaras de eclosão montadas em placas de Petri, contendo ovos de <i>M. javanica</i> sobre ação de diferentes isolados de <i>Pseudomonas</i> do grupo fluorescente.	13
Figura 2 Avaliação correspondente a 72 horas de incubação	14
Figura 3 Contagem de <i>Ditylenchus</i> spp. em câmara de Peters.....	15
Figura 4 Mudanças de alface Cultivar Vera, inoculadas com diferentes isolados de <i>Pseudomonas</i> do grupo fluorescente e <i>Meloidogyne javanica</i>	16

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DA ECLOSÃO DE <i>Meloidogyne javanica</i> in vitro	12
2.2 AVALIAÇÃO DE <i>Pseudomonas</i> DO GRUPO FLUORESCENTE NA MOTILIDADE DE <i>Ditylenchus</i> spp.	13
2.3 CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM ALFACE COM <i>Pseudomonas</i> DO GRUPO FLUORESCENTE	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DE ECLOSÃO DE <i>Meloidogyne javanica in vitro</i>	17
3.2 AVALIAÇÃO DE <i>Pseudomonas</i> DO GRUPO FLUORESCENTE NA MOTILIDADE DE <i>Ditylenchus</i> spp.	18
3.3 CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM ALFACE COM <i>Pseudomonas</i> DO GRUPO FLUORESCENTE	20
4 CONCLUSÕES	23
ABSTRACT	24
REFERÊNCIAS	25

Potencial antagônico de *Pseudomonas* do grupo fluorescente isolada no planalto catarinense no controle de *Ditylenchus* spp. e *Meloidogyne javanica*.

Marcielly Fleck Turatto

Resumo

Pseudomonas do grupo fluorescente são consideradas Rizobactérias Promotora de Crescimento Vegetal (RPCV) por apresentar diversos mecanismos de ação, como promoção de crescimento, produção de fitormônios, substâncias antibióticas, e alteração nos exsudatos radiculares. Essas auxiliam no controle de doenças. Com o objetivo de avaliar microrganismos potenciais no controle de *Meloidogyne javanica* e *Ditylenchus* spp. cinco isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente, obtidos da rizosfera de alho cultivado na Mesorregião de Curitiba (SC) foram testados. Foram montadas câmaras de eclosão em placas de Petri, onde foram adicionados 10mL de suspensão bacteriana por câmara, e uma alíquota de 1mL contendo 4500 ovos de *M. javanica* adicionada sobre papel filtro. O mesmo procedimento foi realizado com 300 juvenis de *Ditylenchus* spp. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições. As avaliações foram realizadas a cada 72 horas. A população de nematoides antagonizada, foi determinada com o auxílio de microscópio e câmara de contagem de Peters e posteriormente determinou-se os percentuais de eclosão e motilidade. Três isolados bacterianos com resultados superiores na etapa *in vitro* foram testados em plantas de alface em casa de vegetação. Essas tiveram suas raízes inoculadas com as bactérias e com 2500 ovos de *M.javanica*. Os isolados obtiveram resultados positivos no controle da eclosão *M. javanica* e motilidade de *Ditylenchus* spp. *in vitro*. Na etapa em casa de vegetação não foi possível obter resultados devido a não formação de galhas.

Palavras chave: Fitonematoides. Nematóide das galhas. Controle biológico. *Pseudomonas* spp. .

1 INTRODUÇÃO

Algumas das culturas mais utilizadas na mesorregião de Curitiba-SC são o alho (*Allium sativum*) e a soja (*Glycine max* (L) Merr.). Essas duas, compõem o principal sistema de rotação, adotado pelos produtores da região. No cenário da produção de alho, Curitiba lidera o ranking dos principais produtores do estado de Santa Catarina.

A produção de soja na região, ainda é discreta, porém, o potencial genético da cultura, gera segurança de mercado, e serve como alternativa para aumentar a renda do produtor.

Assim como todas as culturas, o alho e a Soja, também são suscetíveis a um grande número de pragas e doenças. Dentre esses fatores bióticos, os nematoides causam expressiva quedas nas produções. Esses organismos podem parasitar tanto as raízes, como partes aéreas das plantas atacadas.

O principal nematoide parasita do alho é o *Ditylenchus dipsaci*. Esse se encontra distribuído em todas as regiões de cultivo do Brasil (CHARCHAR; TENENTE; ARAGÃO, 2003). A espécie se torna de difícil controle, devido à falta de produtos químicos liberados pelo Ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA,2014), e ao fato do juvenil de quarto estágio, entrar em anidrobiose (PINHEIRO et al. 2014).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. são os que causam mais danos na cultura da soja (KIMATI et al. 1997). Devido ao monocultivo ou rotação com espécies de plantas que também são hospedeiras, aliado à baixa cobertura do solo, o gênero *Meloidogyne* encontra um ambiente propício para seu desenvolvimento.

Atualmente, o controle dos fitonematoides é feito através do uso de produtos fitossanitários, denominados nematicidas. Esses, por sua vez, são produtos caros, apresentam ação residual, alta toxicidade ao meio ambiente e aos microrganismos presentes no solo (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010). Em virtude dos possíveis impactos negativos que os nematicidas podem provocar (MICHEREFF,2001) e as restrições de uso desses produtos, o controle biológico pode se tornar um grande aliado no controle desses fitoparasitas (SANTOS; SOARES; BARBOSA, 2013).

Uma alternativa ao controle químico é o uso de microrganismos antagonistas. As Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCVs) podem ser potentes agentes no controle biológico de fitonematoides. Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* do grupo fluorescente são os mais estudados e que apresentam maiores correlações com supressividade de solos (BETTIOL et al. 2009). As *Pseudomonas* do grupo fluorescente apresentam diversos mecanismos de ação junto às plantas no controle de doenças (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006).

O principal modo de ação desse grupo de bactérias se dá através da secreção de enzimas, antibióticos, siderofóros, alterações nos exsudatos radiculares, indução de resistência e outros (LUDWIG; MOURA; GOMES, 2013). Esses mecanismos podem ter ações nematicidas. Segundo Becker et al. (1988) as alterações nos exsudatos radiculares, podem inibir a eclosão de ovos dos nematoides, ou até mesmo reduzir a atratividade desses, para as raízes das plantas. Oostendorp; Sikora (1989 apud FREITAS et al. 2005) confirmaram o potencial de isolados de *Pseudomonas fluorescens* no controle de nematoides. Segundo estes autores, os isolados apresentaram potencial de controle de 75% em *Heterodera schachtii*. Os mesmos isolados também controlaram *Meloidogyne* spp. e *Radopholus similis* em milho, banana e tomate. Isolados dessa mesma espécie bacteriana foram relatados como eficientes na inibição de *Meloidogyne incognita* em tabaco, quando inoculados no solo, juntamente com *Trichoderma harzianum*, assemelhando-se a ação dos nematicidas Furadan e Phorate (KHAN; HAQUE, 2011).

Objetivou-se avaliar o efeito de isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente no controle de *Meloidogyne javanica* e *Ditylenchus* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DA ECLOSÃO DE *Meloidogyne javanica* *in vitro*

Foram avaliados cinco isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente (CBSAL02, CBSAL05, CBSAL14, CBSAL18 e CBSAL21) provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Curitibanos. As rizobactérias foram multiplicadas em placas de Petri contendo meio King B sólido e, posteriormente, incubadas em uma câmara bacteriológica por 24 horas a uma temperatura de 28°C. Após o crescimento, foi realizada a suspensão desses isolados em água esterilizada, com auxílio da alça de Drigalski em condições assépticas. Cada suspensão foi acondicionada em Erlenmeyer de vidro esterilizados. Com o auxílio do espectrofotômetro foi determinada a densidade óptica das suspensões bacterianas, ajustada em OD₆₂₅: 0,2.

Os ovos de *Meloidogyne javanica* utilizados no experimento foram fornecidos pelo Dr. Bruno Barbosa da Unesp Jaboticabal.

Foram montadas câmaras de eclosão de acordo com a metodologia proposta por Alves et al. (2011), onde foram adicionados 10 mL de cada suspensão bacteriana (Figura 1). A seguir, adicionou-se sobre o papel filtro uma alíquota de 1 mL, contendo cerca de 4500 ovos de *Meloidogyne javanica*. Como tratamento testemunha foi utilizada apenas água esterilizada e os ovos de *M. Javanica*. As câmaras foram acondicionadas em temperatura de 29°C, por um período de nove dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada uma delas composta por uma câmara de eclosão. A cada 72 horas (três dias) foram retiradas alíquotas das suspensões das câmaras, para avaliação do grau de inibição de eclosão dos ovos por cada suspensão bacteriana.

A população de nematoides eclodidas foi determinada com o auxílio de um microscópio óptico e uma câmara de contagem de Peters. Nematoides recuperados abaixo do papel filtro foram contabilizados como não antagonizado. Obtendo assim a população que sofreu ação dos isolados bacterianos. O volume de suspensão bacteriana recuperado foi repostado

individualmente em cada câmara, após a retirada de acordo com cada tratamento.



Figura 1 Câmaras de eclosão montadas em placas de Petri, contendo ovos de *M. javanica* sobre ação de diferentes isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente.

2.2 AVALIAÇÃO DE *Pseudomonas* DO GRUPO FLUORESCENTE NA MOTILIDADE DE *Ditylenchus* spp.

Foram avaliados cinco isolados bacterianos de *Pseudomonas* do grupo fluorescente (CBSAL02, CBSAL05, CBSAL14, CBSAL18 e CBSAL21) foram multiplicadas em placas de Petri contendo meio King B sólido, e posteriormente incubadas em uma câmara bacteriológica por 24 horas a uma temperatura de 28°C. Após o crescimento, foi realizada a suspensão desses isolados em água esterilizada, com auxílio da alça de Drigalski, em condições assépticas. Cada suspensão foi acondicionada em Erlenmeyer de vidro. Com auxílio do espectrofotômetro foi determinado a densidade óptica das suspensões. Essa foi fixada em OD₆₂₅:0,2.

A população de nematoides foram extraídos de amostras de plantas de alho, possivelmente contaminadas. A metodologia utilizada foi de flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim (COOLEN & D'HERDE, 1972), Após a extração, realizou-se a fixação de indivíduos em placas de Petri contendo formaldeído a 20, e posteriormente iniciou-se a identificação desses através da chave de identificação proposta por MAKETE et al. (2012). Após serem identificados como do gênero *Ditylenchus* spp. a população fixada em 300 nematoides/ml na suspensão extraída. Devido à desuniformidade da população extraída não foi determinado em que estágio de desenvolvimento esses se encontravam.

Foram preparadas câmaras de eclosão, em que foram adicionados 10 mL de cada suspensão bacteriana. A seguir, adicionou-se sobre o papel filtro uma alíquota de 1mL, contendo cerca de 250 indivíduos de *Ditylenchus* spp. em diferentes estádios de desenvolvimento. Como tratamento testemunha foi utilizada apenas água esterilizada adicionado sobre o papel filtro com nematoides. As câmaras foram acondicionadas em temperatura de 29°C, por um período de nove dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada uma delas composta por uma câmara de eclosão.

Em intervalos de 72 horas foram realizadas as coletas das suspensões das câmaras, em que pode ser avaliado o grau antagonismo de cada suspensão bacteriana.

A população de nematoides antagonizada foi determinada com o auxílio de um microscópio óptico e uma câmara de contagem de Peters. Nematoides recuperados abaixo do papel filtro foram contabilizados como não antagonizado. Obtendo assim a população que sofreu ação dos isolados bacterianos. O volume de suspensão bacteriana recuperado foi repostado individualmente em cada câmara, após a retirada de acordo com cada tratamento.



Figura 2 Avaliação correspondente a 72 horas de incubação

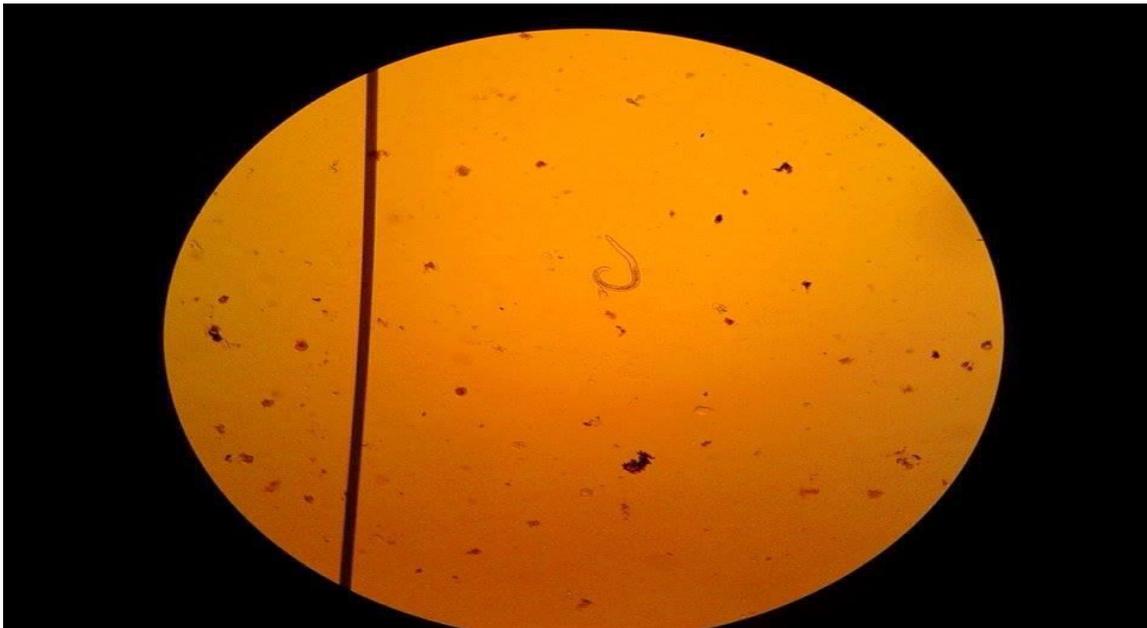


Figura 3 Contagem de *Ditylenchus* spp. em câmara de Peters

2.3 CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM ALFACE COM *Pseudomonas* DO GRUPO FLUORESCENTE

Foram avaliados em casa-de-vegetação, três isolados bacterianos de *Pseudomonas* do grupo fluorescente (CBSAL02, CBSAL05, CBSAL14), provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Curitibanos. Esses isolados foram os que apresentaram resultados superiores aos demais na etapa *in vitro*, de eclosão de *M. javanica*.

Foram utilizadas mudas de alface do cultivar Vera, considerado susceptível a *M.javanica* (ROSSI; SIQUEIRA; LIMA, 2003). Essas estavam com cinco folhas verdadeiras, no início do experimento. As mudas foram lavadas, desinfetadas com solução de hipoclorito 10% e transplantadas para vasos de plásticos de 500g preenchido com solo e areia lavada na proporção 2:1. O substrato e os vasos utilizados foram autoclavados para evitar possível interferência de outros microrganismos.

Após a desinfecção das raízes, as mudas foram inoculadas com as suspensões bacterianas, onde essas ficaram com suas raízes imersas por cinco minutos. Imediatamente após a inoculação, essas mudas foram transplantadas para os vasos. Como tratamento testemunha foi utilizado apenas água esterilizada, onde as raízes ficaram imersas por 5 minutos.

Logo após transplantar as mudas para os vasos, foram adicionados em média 2500 ovos de *Meloidogyne javanica* por vaso. A inoculação com os ovos foi realizada em quatro pontos equidistantes da raiz.

Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação. A irrigação foi realizada a cada dois dias com controle de umidade do substrato de cada vaso.

Após 60 dias, os vasos foram retirados da casa de vegetação para análise das raízes e avaliação de resultados, segundo escala de notas proposta por Taylor e Sasser (1978) (Tabela 1).

Tabela 1 escala de notas para avaliação de infecção de *Meloidogyne* spp.

Escala de notas	Número de galhas
0	0
1	1 a 2
2	3 a 10
3	11 a 30
4	31 a 100
5	Mais de 100

Fonte: Taylor e Sasser (1978).



Figura 4 Mudanças de alface Cultivar Vera, inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente e *Meloidogyne javanica*.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes ao teste de eclosão de *M. javanica* e motilidade de *Ditylenchus* spp. foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com teste de Tukey a 1% e 5% de probabilidade com o programa estatístico Assistat versão 7.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DE ECLOSÃO DE *Meloidogyne javanica* *in vitro*

Para o cálculo de porcentagem de controle, como índice de comparação foi considerado o tratamento testemunhas como 100% de eclosão, ou seja, 0% de controle. Os isolados CBSAL02, CBSAL05 e CBSAL14, foram superiores aos demais tratamentos na avaliação final, levando em consideração a média geral dos tratamentos. Esses apresentaram índices de controle próximos a 74%, 54,77% e 49,33% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Média do número de ovos de *Meloidogyne javanica* eclodidos em câmaras de eclosão durante nove dias sobre ação de diferentes isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente

	Testemunha	CBSAL 21	CBSAL 05	CBSAL 18	CBSAL 02	CBSAL 14
Rep1	3060	2160	1370	2560	760	1490
Rep2	2630	2080	1250	2480	680	1370
Rep3	2740	2160	1220	2250	760	1450
Rep4	2780	2010	1230	2240	720	1370
Média	2802,5 ^a	2102,5 ^c	1267,5 ^d	2382,5 ^b	730 ^e	1420 ^d
% Eclosão	100%	75%	45,23%	114%	26%	50,67%
Controle	0%	25%	54,77%	-14%	74%	49,33%

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si. Aplicado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados referentes à imersão dos ovos de *M. javanica*, em suspensões dos isolados bacterianos CBSAL21, CBSAL18, CBSAL02, CBSAL05 e CBSAL14 por nove dias, diferiram estatisticamente entre si, indicando que os isolados possuíam algum tipo de ação ovicida.

Estudos realizados por Stirling (1991) confirmam que alguns isolados de rizobactérias são capazes de sintetizar metabólitos tóxicos, afetando o movimento e a eclosão de juvenis de diferentes gêneros de nematoides.

Alves et al. (2011) demonstraram em trabalho realizado *in vitro*, o potencial de diferentes isolados de rizobactérias com ação na motilidade e ovicida de *M. javanica*, *M. incognita* e *P. zaeae*.

Neves et al. (2000), testando isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* contra *M. incognita* e *M. javanica* em tomateiro, observaram redução de 77,4% de ovos e 66,4% de galhas, quando comparados com a testemunha.

Khan et al. (2004) constataram a produção de proteases e quitinases por um isolado de *Paecilomyces lilacinus*. Esses observaram que essas substâncias atuavam em conjunto, destruindo a camada lipídica que é essencial para o desenvolvimento e manutenção do nematoide no interior do ovo, hidrólise da camada de quitina do ovo e, também, a integridade da camada vitelínica, prejudicando assim o desenvolvimento e eclosão.

Araújo et al. (2010) comprovaram a eficácia de isolados de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. no controle de *Radopholus similis*, causador de necroses radiculares em plantas de bananeiras. Os mesmos ainda ressaltam a prevalência dos gêneros dessas bactérias em rizosfera de diferentes plantas.

Souza Júnior et al. (2010) avaliaram a mistura de diferentes isolados de rizobactérias no controle de *Meloidogyne graminicola* em plântulas de arroz com sementes microbiolizadas. Nesse trabalho, os autores observaram redução no número de galhas, número de ovos e fator de reprodução de *M. graminicola*.

A ação ovicida por parte de RPCV's, pode estar ligada a produção de quitinases ou outras enzimas degradadoras de parede celular pelos isolados. Essas auxiliariam na degradação da parede celular dos ovos de *M. javanica*, e posteriormente, prejudicariam o desenvolvimento do nematoide. Esse dano seria causado pela ação de substâncias antibióticas, após a eclosão dos juvenis, ou ainda, no interior do ovo.

3.2 AVALIAÇÃO DE *Pseudomonas* DO GRUPO FLUORESCENTE NA MOTILIDADE DE *Ditylenchus* spp.

Em relação aos resultados, os isolados CBSAL02, CBSAL05, CBSAL18, CBSAL21, diferiram, estatisticamente da testemunha, enquanto o isolado CBSAL14, se igualou estatisticamente aos demais tratamentos e a testemunha.

Os isolados CBSAL21, CBSAL02, e CBSAL05 apresentaram controle de 54,36%, 55,19%, 53,53% respectivamente, demonstrando seu potencial de controle. O isolado CBSAL14 apresentou controle de 36,09% (tabela 3).

Tabela 3 Motilidade de juvenis de diferentes estádios de *Ditylenchus* spp. recuperados em câmaras com papel filtro durante nove dias sobre ação de diferentes isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente

CBSAL18	CBSAL14	CBSAL21	CBSAL02	CBSAL05	Testemunha	
Rep1	24	54	29	33	30	57
Rep2	53	32	31	21	29	64
Rep3	37	44	27	27	23	57
Rep4	40	53	23	27	30	63
Total	154b	183ab	110b	108b	112b	241a
Médias	5.92186b	6.72967ab	5.23623b	5.17986b	5.28386b	7.75923a
% Controle	36,09%	24,09%	54,36%	55,19%	53,53%	0,00%

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si. Aplicado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Melnick et al. (2011) citaram o potencial de rizobactérias, como *Pseudomonas fluorescens*, no biocontrole de doenças, através da produção de substâncias que como proteases, celulasas e quitinases. Essas são capazes de degradar parede celular de diversos microrganismos, incluindo fitonematoides. Pérez-Garcia et al. (2011), também destacam a produção de substâncias degradadoras de parede celular e produção de antibióticos, por *Pseudomonas* spp.

O reconhecimento da planta por parte do hospedeiro é fator primordial na infecção por nematoide. A identificação da planta pelo nematoide é realizada através dos exsudatos radiculares, para onde esses irão migrar até o sitio de infecção. *Pseudomonas* spp. (MELO; AZEVEDO.,1998) possuem a capacidade de alterar exsudatos radiculares, dificultando, assim, o reconhecimento do sitio de alimentação por parte de nematoides presentes no solo. Siddiqui; Mahmood, (1999) e Tian et al. (2007) observaram a interferência no processo de reconhecimento através de modificações de exsudatos, por bactérias endofíticas, como um método de controle de nematoides.

Oostendorp; Sikora (1990) descreveram a atuação de rizobactérias no controle de nematoides, destacando a alteração de exsudatos radiculares, onde esses atuam como desestimulante ao nematoide, inibindo a eclosão ou prejudicando a migração desses até às raízes. Essas alterações também podem resultar em menor atratividade para as raízes, por parte de *Ditylenchus dipsaci* presentes no solo.

Pseudomonas spp. podem ser bactérias endofíticas, ou seja, possuem a habilidade de colonizar os tecidos das plantas. Nesse processo de colonização,

essas produzem diferentes substâncias, entre elas algumas com propriedades antibióticas (MARIANO et al. 2004). O tratamento de alho-sementes é realizado com nematicidas e outros inseticidas químicos no plantio, esses atuam no interior dos tecidos, de forma muito semelhante a algumas rizobactérias. Essas poderiam auxiliar no controle ou diminuir a mobilidade de *Ditylenchus* no interior dos tecidos, resultando assim em menores danos.

Em condições de campo, o nematoide *D. dipsaci* pode ser encontrado no solo ou em bulbilhos infectados. Considerando as características de rizobactérias como *Pseudomonas* do grupo fluorescentes, essas poderiam agir de duas maneiras no controle de *Ditylenchus dipsaci*. A primeira é a colonização endofítica promovida por essas bactérias, e assim, essas poderiam produzir substâncias antibióticas, controlando ou cessando, o desenvolvimento de *D. dipsaci* no interior do tecido vegetal. Diminuindo assim, os danos na planta em desenvolvimento e a propagação da espécie em campos produtores de alho.

A segunda seria a alteração dos exsudatos radiculares que as espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente promovem. Essas alterações reduzem a atratividade dos nematoides presentes no solo, para a planta hospedeira. Possibilitando assim o reuso de campos infestados com *D. dipsaci* por parte dos produtores.

As duas hipóteses acima citadas, só poderão ser confirmadas a partir de estudos mais detalhados, como experimentações *in vitro* e *in vivo*.

Além de potenciais agentes no controle biológico, as rizobactérias, também possuem ação como promotoras de crescimento vegetal. Aumentando, ainda mais, os benefícios para a planta colonizada.

3.3 CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM ALFACE COM *Pseudomonas* DO GRUPO FLUORESCENTE

Segundo a escala de notas proposta por Taylor e Sasser (1978), a infecção nas plantas foi classificada com nota 0, ou seja, não ocorreu a formação de galhas. Onde não obteve-se resultados quantitativos e qualitativos referentes a essa etapa do experimento.

Diferentes fatores podem influenciar a ocorrência da infecção e/ou da formação de galha. Podendo ser eles, físicos, químicos ou biológicos. Segundo Tihohod (1993), fatores edafoclimáticos, como temperatura, umidade, porosidade, textura e estrutura do solo, afetam o movimento de nematoides no solo.

Arieira et al. (2008) relataram que a eclosão de nematoides pode ocorrer de duas maneiras: espontânea ou por estímulos. Na espontânea, os nematoides eclodem logo após o término do desenvolvimento embrionário, ou também, podem sofrer influências ambientais, como temperatura, e umidade. Esse tipo de eclosão ocorre, na maioria das vezes, em nematoides de vida livre.

A eclosão através de estímulos pode ocorrer por fatores endógenos ou exógenos. Os exógenos são principalmente umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio. Já os endógenos, são fatores relacionados ao nematoide em si, como permeabilidade da membrana dos ovos, produção de enzimas associadas à hidrólise de lipídios, percepção de estímulos, como exsudatos radiculares, entre outros (ARIEIRA, 2008).

Os mecanismos de eclosão estão ligados a dois fatores: quiescência e diapausa. A quiescência é o estado em que o nematoide permanece dormente, até que as condições ideais estejam presentes. Esse mecanismo está ligado a fatores exógenos. Na diapausa, esses cessam seu desenvolvimento. Esse é utilizado por diferentes espécies do reino animal, como forma de sobrevivência em diferentes condições climáticas, e ocorre por fatores endógenos (RITZINGER; FANCELI; RITZINGER,2010) (ARIEIRA, 2008).

Sheperd e Clark (1971) apresentaram temperaturas ideais para que ocorra a eclosão de algumas espécies de nematoides. Entre essas temperaturas, os autores indicam que a ideal para a eclosão de *M. javanica*, é de 30°C.

Para estabelecer seu sitio de alimentação o nematoide necessita de inúmeros fatores ao seu favor. Após eclodir, o juvenil de segundo estágio (J2), passa a migrar pelo solo a procura de raízes para estabelecer seu sitio de alimentação. Para que essa migração ocorra, o J2 é guiado através de exsudatos radiculares. Esse e outros compostos orgânicos e inorgânicos são

agentes que interferem no estabelecimento da interação planta-hospedeiro (SANTANA, 2012).

Como citados anteriormente, são diversos os fatores necessários para que ocorra a infecção do nematoide em uma planta. A falha na infecção nas plantas de alface no experimento pode ter ocorrido pela falta de um desses fatores.

4 CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, os isolados bacterianos CBSAL02, CBSAL05 e CBSAL14 e CBSAL21 proporcionaram ação ovicida de *M. javanica*.

Os isolados CBSAL21, CBSAL02, CBSAL05, mostraram maior potencial de controle de *Ditylenchus* spp. que os demais, quando comparados ao tratamento testemunha.

Os isolados acima citado apresentaram ação na motilidade de *Ditylenchus* spp. no teste *in vitro*. Porém, tem-se a necessidade de estudos mais detalhados sobre a ação desses isolados sobre o nematoides, estudos *in vivo* e a nível de campo. Isso auxiliaria e fomentaria, ainda mais, as pesquisas sobre esse patógeno, que apesar de tão destrutivo, não é tão divulgado e estudado como os demais fitonematoides.

A região onde Curitiba-SC, é potencialmente fria e úmida. Microrganismos isolados em outras regiões do país, podem não se adaptar às condições climáticas do local. Dessa maneira, é de suma importância o estudo detalhado de agentes biológicos que estejam adaptados as condições locais.

Antagonistic potential of *Pseudomonas*'s fluorescent group isolated in Santa Catarina plateau in control of *Ditylenchus* spp. and *Meloidogyne javanica*.

Abstract

The group of fluorescent *Pseudomonas* are considered Rhizobacteria Promoting Plant Growth (RPPG) for presenting different mechanisms of action, such as promoting growth, phytohormones production, antibiotic substances, and changes in root exudates. These help control diseases. In order to evaluate potential microorganisms in control of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp., five isolates of fluorescent *Pseudomonas*, obtained from cultivated garlic rhizosphere in mesoregion of Curitiba (SC) were tested. Hatching chambers were mounted in Petri dishes, which were added 10 ml of bacterial suspension per chamber and a 1 ml aliquot containing 4500 eggs of *M. javanica* added on filter paper. The same procedure was performed with 300 juvenile *Ditylenchus* spp. The experimental design was completely randomized, with four repetitions. The evaluations were performed every 72 hours. The population of nematodes hatched from *M. Javanica* and recovered from *Ditylenchus* spp. was determined with the aid of a microscope and Peters counting chamber and then determined the percentage of hatching and motility. Three isolates bacterial with superior results in vitro stage were tested in lettuce plants in a greenhouse. These had their roots inoculated with bacteria and 2500 eggs *M.javanica*. Isolates obtained positive results in controlling the outbreak *M. javanica* and motility *Ditylenchus* spp. *in vitro*. In step under greenhouse conditions it was not possible to obtain results due to no infection.

Key words: Plant-parasitic nematodes. Root-knot nematode. Biological control. *Pseudomonas* spp ,.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, K. S et al. **Avaliação e identificação de *Pseudomonas* sp. e**

***Bacillus* sp. dois isolados de rizobactérias antagônicas a *Radopholus similis*.** Brasília: Embrapa, 2010. 2 p.

ARIEIRA, R.D.C; et al. **Fatores que afetam a eclosão de fitonematoides.** RAPP. V.16, 305-337, 2008.

ALVES, G. C. S et al. Avaliação in vitro do efeito de rizobacterias sobre

Meloidogyne incognita, *M javanica* e *Prathylenchus zea*. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 78, n. 4, p.557-564, out. 2011.

BECKER, J.O, ZAVALETA-MEJIA E, COLBERT SF, SCHROTH MN, WEINHOLD AR, HANCOCK JG, VAN GUNDY SD (1988) Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. **Phytopathology** 78:1466-1469

BECKER, W. F. Pesquisas com *Ditylenchus dipsaci* em Santa Catarina. In: **SIMPÓSIO DE DITYLENCHUS DIPSACI EM ALHO**, 1., 1983, Itajaí. Anais... . Itajaí: Sob, 1983. p. 17 - 18.

BECKER, Walter Ferreira. Doenças causadas por nematoide em Alho. **Informe Agropecuário: doenças em hortaliças**, Belo Horizonte, v. 17, n. 2, p.22-26, jan. 1995.

BETTIOL, Wagner et al. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: PLANTAS, Biocontrole de Doenças de; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A B (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa, 2009. Cap. 12. p. 187-190.

BOTELHO, G. R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of Crops - an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.401-416, 2006.

BARBOSA, D. B. **O mercado agrícola globalizado: A crise na lavoura de alho em curitibanos.** 2009. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Geografiasocioeconomica/Geografiaagricola/10.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2014.

CHARCHAR, J M.; C.V.TENENTE, R; ARAGÃO, F A.S.. **Resistencia de cultivares de alho a *Ditylechus dipsaci*. Nematologia Brasileira**, Brasilia-DF, v. 27, p.179-184, nov. 2003.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J.. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Gent: State Agricultural Research Center, 1972. 77 p.

FREITAS, Leandro G et al. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematoides fornecedores de galha (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Viçosa, v. 29, n. 2, p.215-220, out. 2005.

EPAMIG (Minas Gerais). **Informe agropecuário: Cultura da cebola**. Belo Horizonte: S/ed, 2002. 99 p.

IBGE. **Produção Agrícola municipal**. 2012. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=420480&idte_ma=123&search=santa-catarina|curitibanos|producao-agricola-municipal-lavoura-temporaria-2012>. Acesso em: 09 out 2015.

JAEHN, A; KIMOTO, T. **Amostragem de bulbos de alho em campos infestados por *Ditylenchus dipsaci***. Nematologia Brasileira, Botucatu-SP, v. 18, p.35-41, jun. 1994.

KIMATI, Hiroshi et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de planta cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1997.

LUDWIG, Juliane; MOURA, Andréa B.; GOMES, Cesar B.. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, Campo Grande, v. 38, n. 3, p.264-268, jun. 2013.

MAPA. **Agrofit**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 28 set. 2014.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. **IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIENCIA AGRONÔMICA, 1., 2004, Recife: Anais, 2004. p. 89 - 111.

MELNICK, R. L.; SUÁREZ, C.; BAILEY, B. A; BACKMAN, P. A. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential

biological control agents of cacao diseases. **Biological Control**, v. 57. p.236-245, 2011.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998. 488 p.

MEKETE T., et al. (2012). Identification key for agriculturally important plant-parasitic nematodes Prepared for the International Nematode Diagnosis and Identification Course 2012 - **A manual for nematology**. Mexico, D.F.: CIMMYT.

MICHEREFF, Sami J. **Fundamentos de Fitopatologia**. I Recife: S/ed, 2001. 133 p.

OOSTENDORP, M. & R.A. SIKORA. 1990. In vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, 14: 269-274

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22. p.187-193, 2011.

PINHEIRO, J.B; et al. **Nematoides na cultura do alho e cebola**. Brasília-DF: Embrapa Hortaliça, 2014. 8 p.

RITZINGER, Cecília Helena Silvino Prata; FANCELLI, Marileneand RITZINGER, Rogério. **Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas**. *Rev. Bras. Frutic.* [online].

2010, vol.32, n.4, pp. 1289-1296. ISSN 0100-2945.

ROSSI, C. E.; SIQUEIRA, R. N. D. P.; LIMA, C. B. Reação de hortaliças herbáceas aos nematóides de galha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, jul. 2003.

SANTANA, F. A. **Análise proteômica de raízes de soja em resposta a inoculação com nematoides da galha**.(tese).UFV, Viçosa. 112p. 2012

SANTOS, Jaime Maia Dos; SOARES, Pedro Luiz Martins; BARBOSA, Bruno Flávio Figueiredo. **Curso de Atualização em Nematologia**. S.l: S/ed, 2013. 143 p. CD-ROM.

SHEPERD, A.M.;CLARKE,A.J. Molting and hatching stimuli. In:ZUCKERMAN, B.M., MAI,W.F.; ROHDE, R.A. (Eds).Plant parasitic nematodes II: Cytogenetics, host-parasite, interations, and Physiology. Academic Press, New York. P 87-267. 1971.

SOUZA JÚNIOR, Ismail Teodoro de et al. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p.1259-1267, nov. 2010.

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.

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

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

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

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 61, p. 197-213,2007.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S.. Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. In: NOE, James P.. **Nematoides parasitas de plantas**. 2. ed. São Paulo - Sp: Artmed, 2010. Cap. 8, p. 83-96.