BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM CAFÉ

ANA CLAUDIA DA SILVA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Ana Claudia da
Bactérias endofíticas envolvidas no controle de *Meloidogyne incognita* em Café /
Ana Claudia da Silva. -- Piracicaba, 2004.
42 p.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Bactéria endofítica 2. Café 3. Controle biológico (Fitossanidade) 4. Nematóide
parasito de planta I. Título

CDD 633.73

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha mãe Maria José (“in memoriam”),

Meu carinho e gratidão pelo apoio que sempre recebi

Dedico

À minha irmã Paula, pela amizade e auxílio

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pela orientação e coragem para enfrentar os momentos difíceis.

À FAPESP, pelo suporte financeiro através de uma Bolsa de Estudos.

Obrigada ao Prof. Dr. Mário Massayuki Inomoto, pelo exemplo de profissionalismo, amor e dedicação à pesquisa e principalmente pela paciência e a valiosa orientação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia que contribuíram para a minha formação profissional.

Obrigada aos companheiros do Departamento Andressa, Edimilson, Aníbal, Sonia, Melissa e Kércya, pela amizade e colaboração.

Obrigada aos pesquisadores da Embrapa-Jaguariúna Dr. Pedro José Valarini Dr. Itamar S. Melo pela co-orientação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Microrganismos endofíticos no controle de fitonematóides.....	7
2.2 Mecanismos do controle biológico	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Produção do inóculo de nematóides	15
3.2 Coleta do material vegetal para isolamento de bactérias endofíticas.....	15
3.3 Isolamento de bactérias endofíticas.....	16
3.4 Produção do inóculo bacteriano.....	17
3.5 Avaliação do efeito antagônico dos isolados das bactérias endofíticas (teste <i>in vitro</i>).....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Isolamento de bactérias endofíticas	20
4.2 Avaliação do efeito antagônico dos isolados das bactérias endofíticas (testes <i>in vitro</i>)	22

5 CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Planta amostrada e códigos das bactérias endofíticas isoladas em plantas de café selecionadas para serem testadas como controle biológico de fitonematóides do gênero <i>Meloidogyne</i>	18
2 Planta amostrada e códigos das bactérias endofíticas isoladas em plantas de café em 3 regiões do Estado de São Paulo.....	21
3 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no primeiro ensaio <i>in vitro</i>	22
4 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no segundo ensaio <i>in vitro</i>	23
5 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no terceiro ensaio <i>in vitro</i>	23
6 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no quarto ensaio <i>in vitro</i>	24
7 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no quinto ensaio <i>in vitro</i>	24
8 Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no sexto ensaio <i>in vitro</i>	25

9	Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no sétimo ensaio <i>in vitro</i>	25
10	Porcentagem média de <i>Meloidogyne incognita</i> que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no oitavo ensaio <i>in vitro</i>	26

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DE

***Meloidogyne incognita* EM CAFÉ**

Autora: ANA CLAUDIA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO

RESUMO

No interior das plantas, existem bactérias e fungos que vivem em colonização assintomática, sendo denominados microrganismos endofíticos. Esses microrganismos podem ser utilizados no controle de fitonematóides. No presente trabalho, isolaram-se, pelo método de fragmentos do tecido vegetal, 161 bactérias endofíticas do sistema radicular de cafeeiros em três regiões do estado de São Paulo. Após análise morfológica das colônias isoladas, foram selecionadas 54 bactérias para serem avaliadas quanto ao potencial de controle biológico de fitonematóides, por meio de testes *in vitro* em que se verificou seu efeito sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Dos isolados testados, vinte e três (TR1Ilg, TR5IIId, TR9IIIf, TR1IIId, TR3IIb, TR1IIe, TR1Id, TR5Ia2, TR5Id, TR4IIa, TR7IIb, TR8IIc, TR8IIId

TR3a, TR7IIIa, TR7IIIb, TR8IIIb, TR8IIIa, TR9IE, TR9IIIE, TR9IIIb3, TR10Ib, TR9IIc) provocaram maior porcentagem de morte dos nematóides, quando comparado com a testemunha sem bactéria. Portanto, os isolados de bactérias endofíticas testados demonstraram potencial para controle biológico do nematóide.

ENDOPHYTIC BACTERIA INVOLVED IN THE CONTROL OF

***Meloidogyne incognita* IN COFFEE**

Author: ANA CLAUDIA DA SILVA

Adviser: Prof. Dr. MÁRIO MASSAYUKI INOMOTO

SUMMARY

Endophytic microorganisms are bacteria and fungi that cause asymptomatic colonization inside the tissues of living plants. Those microorganisms might be used in control of the phytoparasitic nematodes. In the present work, 161 endophytic bacteria were isolated from coffee roots collected in three regions of São Paulo state. Fifty four isolates were chosen, based on morphological features, to be evaluated for their potentiality in biological control of phytonematodes. In vitro assays were carried out in order to evaluate the effect of the isolates on mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. Twenty three isolates (TR1Ig, TR5IIId, TR9IIc, TR1IIId, TR3IIb, TR1IIe, TR1Id, TR5Ia2, TR5Id, TR4IIa, TR7IIb, TR8IIc, TR8IIId, TR3a, TR7IIa, TR7IIb, TR8IIb, TR8IIa, TR9IE, TR9IIIE, TR9IIb3, TR10Ib, TR9IIc) caused larger mortality of nematodes, in comparison with the control. Thus, those

bacteria isolates proved to be potentially valuable as biological control agents of *M. incognita*.

1 INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitos são importantes patógenos de várias plantas cultivadas no Brasil. Estima-se que os fitonematóides causam perdas de produção da ordem de 10 % nas principais culturas (Weischer, 1994). Cerca de 2.000 espécies de plantas são atacadas por nematóides de raízes (Sasser, 1980). Muitos gêneros e espécies de nematóides são associados com café em muitos países do mundo, causando grandes prejuízos (Campos *et al.*, 1990; Lordello *et al.*, 2001; Santos, 1996).

Vários métodos de controle de nematóides têm sido estudados, como nematicidas, rotação de culturas, cultivares resistentes ou tolerantes e controle biológico (Ribeiro, 1999; Tamayo, 1972; Weischer, 1994). A resistência específica, muito comum nos vegetais, e o freqüente antagonismo entre rusticidade e características agrícolas desejáveis, são os mais importantes obstáculos do controle varietal (Novaretti, 1986), por isso, cultivares resistentes nem sempre são utilizados para o controle de fitonematóides. O uso de produtos químicos tóxicos é observado com desaprovação em muitos países, e alguns componentes destes produtos têm perdido seus registros (Thomson, 1992). O controle químico de nematóides apresenta vários inconvenientes, entre os principais está o custo elevado, o risco de contaminação do meio ambiente e da intoxicação do homem (Novaretti, 1986; Weischer, 1994). Devido à associação com

problemas de toxicidade, o uso de nematicidas está sendo abandonado em muitos países (Jung *et al.*, 1998).

O controle biológico inclui: a) práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou a ambas; b) melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; c) introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros agentes benéficos (Bettiol & Ghini, 1995).

Apesar do grande potencial já verificado com o controle biológico de fitopatógenos de solo, principalmente com a utilização de rizobactérias, para o caso de nematóides, a literatura nesse campo é bastante restrita e há a necessidade de mais pesquisas na área de controle biológico, visto que os métodos tradicionais utilizados são bastante limitados.

As bactérias endofíticas vêm demonstrando, em vários estudos, grande potencial para promover controle de diversas doenças em plantas causadas por fungos, bactérias e nematóides. As bactérias endofíticas fazem parte da microflora natural de tecidos internos de plantas saudáveis. O tecido interno das plantas são ambiente de relativa uniformidade e proteção, quando comparadas com o ambiente colonizado pelas bactérias ectofíticas, que estão sujeitas a competição por nutrientes com outros microrganismos e a flutuações de temperatura do ambiente (Chen *et al.*, 1995). Por isso, as bactérias endofíticas podem ser consideradas candidatas potenciais para o controle biológico de nematóides.

No entanto, apesar das vantagens, o potencial das bactérias endofíticas têm sido pouco explorado (Ramamoorthy, 2001). O presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de:

- Isolar e selecionar bactérias endofíticas de plantas de café no estado de São Paulo.
- Verificar os mecanismos de ação de bactérias endofíticas sobre o nematóide *Meloidogyne incognita*.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos metabólitos produzidos pelos isolados das bactérias endofíticas na mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Existem mais de 200 diferentes organismos considerados inimigos naturais dos nematóides parasitas de plantas, entre os quais podem ser citados fungos, bactérias, nematóides predadores, tardígrados, riquetsias, copépodes, colêmbolas e ácaros (Kerry, 1990; Novaretti, 1991).

Segundo Kerry (1990) pode-se considerar quatro maneiras para proceder ao controle de nematóides por agentes microbianos: 1) exploração da supressividade do solo; 2) modificações no solo para propiciar a atividade de microrganismos; 3) aplicações de linhagens selecionadas de bactérias e fungos; e 4) enzimas ou toxinas microbianas.

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico de nematóide está a bactéria *Pasteuria penetrans*, que segundo Stirling (1984) apresenta alto potencial para o controle biológico de nematóides de raízes em culturas anuais. Quando a bactéria foi previamente incorporada no solo em plantações de tomate, houve redução do dano causado pelo nematóide *Meloidogyne javanica*, o qual foi similar ao conseguido com a utilização do nematicida fenamifós.

Outros microrganismos, como as rizobactérias *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas mendocina*, foram citadas por Dupponnois e colaboradores, que

observaram diminuição no número de massas de ovos do nematóide *Meloidogyne javanica* em tomate pelas rizobactérias. Quando as rizobactérias foram aplicadas juntamente com a bactéria *Pasteuria penetrans*, verificou-se aumento de 10 vezes na quantidade de endósporos da *P. penetrans*, além de maior adesão dos endósporos nos nematóides, e conseqüentemente aumento no controle dos nematóides, demonstrando-se interação entre as rizobactérias e *P. penetrans* (Dupponnois *et al.*, 1999).

Entretanto, o principal problema da utilização de *P. penetrans* como agente de controle biológico está na impossibilidade de se multiplicar essa bactéria em qualquer dos meios de cultura existentes, na difícil manutenção e manuseio do inóculo, e na especificidade dos hospedeiros (Freitas & Carneiro, 2000; Novaretti, 1986).

Fungos predadores também são estudados para o controle biológico de nematóides. Esses fungos capturam os nematóides através de órgãos adesivos ou de anéis (Jansson, 1997; Novaretti, 1986). Tem-se verificado maior interesse nos fungos que capturam os nematóides com armadilhas especializadas: redes adesivas tridimensionais, bidimensionais, hifas adesivas não modificadas, ramificações adesivas, nódulos adesivos, anéis constritores e anéis não constritores Gray (1988). Dalla Pria (1992), estudando fungos predadores em testes *in vitro*, verificou que os fungos *Monacrosporium eudermatun*, *M. parvicollis*, *M. ellipsoforum*, *M. drechsleri*, *M. gephyrophagum* e *M. ameliae* possuíam alta capacidade predatória para nematóides do gênero *Pratylenchus*. Santos (1996), estudando o potencial de 18 fungos nematófagos, observou que o fungo *M. ellipsoforum* foi o mais eficiente na redução da população de *Pratylenchus brachyurus* em condições de casa de vegetação nas culturas de feijão, tomate e alface. Embora a população do nematóide possa ser significativamente

reduzida quando comparada à testemunha, o tratamento não previne o aumento posterior da população de nematóides (Novaretti, 1986).

A habilidade dos fungos predadores formadores de armadilhas em colonizar a rizosfera das plantas pode ser importante fator no controle biológico de nematóides que infectam raízes. Persson & Jansson (1999) avaliaram 38 isolados de fungos e observaram que os fungos *Arthrobotrys dactyloides*, *A. superba*, e *Monacrosporium ellipsosporum* foram os mais freqüentemente detectados na rizosfera de tomate. Mas nenhum dos fungos reduziu *Meloidogyne* spp. das raízes de tomate.

Embora grande número de fungos tenha sido relatado reduzindo densidade de nematóides, poucos têm mostrado eficácia como parasitas de nematóides. Quando se fala em controle biológico de nematóides com a adição de microrganismos, deve-se lembrar que muitos organismos estão em estado de equilíbrio dinâmico e, quando se faz a adição de grandes quantidades de um determinado microrganismo, pode-se ativar o “efeito de tampão biológico”. Assim, o organismo introduzido poderá ter sua população drasticamente reduzida em curto espaço de tempo (Weicher & Brown, 2001).

Existem vários fungos com grande capacidade predatório de nematóides parasitas de plantas, mas geralmente os maiores sucessos são conseguidos em testes de laboratório. Porém, quando esses fungos são testados em campo, onde existe grande quantidade de outros organismos, os resultados não são animadores. Muitas vezes os fungos selecionados não têm grande capacidade competitiva, portanto o maior desafio para os nematologistas é encontrar um caminho para a possível utilização desses microrganismos.

2.1 Microrganismos endofíticos no controle de fitonematóides

Nematóides fitopatogênicos também podem ser controlados biologicamente através de microrganismos endofíticos (Hallmann & Sikora, 1996; Hallmann *et al.*, 1999). Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas (Azevedo, 1998). Segundo Hallman *et al.* (1997), bactérias endofíticas estão presentes na maioria das espécies vegetais, sendo encontradas em estado latente ou colonizando ativamente os tecidos das plantas, de forma local ou sistêmica. As bactérias e fungos endofíticos são isoladas do tecido interno das plantas desinfetadas superficialmente ou extraídos de dentro da planta.

As bactérias e fungos endofíticos são constantemente relatados dentro das raízes, folhas, sementes, óvulos e caules (Lamb *et al.*, 1996; Mundt & Hinkle, 1976). Esses microrganismos colonizam o córtex da raiz (Vance, 1983), as células da epiderme (Jacobs *et al.*, 1985), os espaços intercelulares próximos à superfície (Dong *et al.*, 1994) e o sistema vascular, sendo que os vasos do xilema são considerados o reservatório interno das populações de bactérias (Bell *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1985).

Diversos trabalhos obtiveram o isolamento de bactérias e fungos de variadas espécies vegetais, assim como o potencial de controle biológico desses microrganismos em relação a nematóides. Araújo & Azevedo (1995) isolaram, em porta enxertos de *Citrus* sp., os fungos endofíticos *Colletotrichum* sp., *Guinardia* sp. e *Cladosporium* sp. e as bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*. Fungos endofíticos não patogênicos são importantes em regular a interação entre nematóides fitopatogênicos e seu hospedeiro (Hallman & Shikora, 1994b). Segundo Hallman &

Sikora (1996), fungos endofíticos isolados de raízes de tomate produzem metabólitos secundários que são tóxicos a juvenis de *M. incognita*, e foi verificado que exposição de 10 minutos afetou a mobilidade dos nematóides. Com 60 minutos de exposição 98 % dos juvenis foram inativados, após 5 horas 50 % dos juvenis estavam mortos, e após 24 horas foi observado 100 % de mortalidade. (Hallman & Sikora, 1994b) isolaram raças endofíticas de *Fusarium oxysporum* não patogênicos de plantas de tomate, os quais reduziram 50 % da infecção e reprodução de *M. incognita* em experimentos *in vivo*. Em experimentos *in vitro*, conduzidos com filtrados das culturas do *F. oxysporum*, foi observada completa inativação de juvenis de *M. incognita* após 60 minutos de exposição do nematóide ao filtrado e sua morte após oito horas de exposição.

As bactérias endofíticas colonizam o mesmo tecido radicular que os nematóides fitoparasitas sedentários, assim essa associação de bactérias com nematóides, durante todo o ciclo do nematóide, faz delas excelentes candidatas para estratégias de biocontrole de nematóides (Hallmann *et al.*, 1999).

Naves (2000), isolando bactérias endofíticas do sistema radicular de diferentes espécies de plantas, obteve 81 isolados de bactérias endofíticas, sendo 22 a partir do sistema radicular de plantas de braquiária (*Brachiaria* sp.), 8 de crotalaria (*Crotalaria* sp.), 26 de milho (*Zea mays*), 7 de pimentão (*Capsicum annuum*), 2 de cravo de defunto (*Tagetes erecta*), 11 de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e 5 de trigo (*Triticum aestivum*). Os filtrados das culturas das bactérias endofíticas afetaram a motilidade, aumentaram a mortalidade e a eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

Hallmann *et al.* (1999) isolaram bactérias endofíticas de plantas de algodão provenientes de solo acrescido com quitina e solo sem a adição de quitina. No solo sem a adição de quitina, 61 % do total da população isolada foi dominada pela espécie *Phyllobacterium rubiacearum*. As outras espécies isoladas foram *Burkholderia cepacia* (9 %), *Burkholderia cepacia* (9 %), *Phyllobacterium myrsinacearum* (8 %). No solo acrescido de quitina, a população endofítica isolada foi dominada pela espécie *Burkholderia cepacia* com 73 % do total da população isolada. Em todas as amostras houve predominância de uma linhagem, com frequência de no mínimo de 44 %. Em testes para selecionar bactérias endofíticas para controlar fitonematóides, observou-se que 5 de 12 linhagens de *Burkholderia cepacia* isoladas de raízes de algodão proporcionaram controle entre 30 e 50% de *M. incognita*. Efeitos benéficos para as plantas proporcionados por *Burkholderia cepacia* já foram extensivamente relatados, enfatizando o enorme potencial dessa espécie na interação planta-microrganismo (Parke *et al.*, 1991; Hebbar *et al.*, 1992). Hallmann *et al.* (1999) sugerem que as espécies de bactérias endofíticas, isoladas do solo com adição de quitina, podem contribuir para a supressividade de *M. incognita*. Embora as bactérias isoladas no meio TSA 5 % representem apenas uma pequena quantidade do total da comunidade bacteriana endofítica, essa bactéria pode ser facilmente cultivada e aplicada em estratégias de biocontrole, justificando o grande interesse nesse tipo de bactéria.

Em outro experimento Hallmann *et al.* (1998), isolando bactérias endofíticas em algodão, observou que a distribuição foi muitas vezes inconstante e com alta variabilidade entre as diferentes amostras das plantas, sendo portanto difícil estabelecer um padrão de ocorrência. No entanto, *Agrobacterium radiobacter* e

Pseudomonas spp. foram dominantes em todos os tratamentos. *Alcaligenes*, *Xylosoxydans* e *Burkholderia pichettii* foram isoladas somente em raízes infestadas com o nematóide *M. incognita*. Os autores acreditam que os nematóides do gênero *Meloidogyne* exercem efeito indireto sobre a ocorrência das bactérias endofíticas, ao causar alterações fisiológicas nas plantas infectadas. Assumindo que as diferentes bactérias apresentam exigências nutricionais variadas, tais alterações podem influenciar a ocorrência das bactérias. Assim, estratégias de biocontrole de nematóides devem levar em conta não apenas o potencial antagonista dos microrganismos, mas também a capacidade de desenvolvimento em infectadas por *M. incognita*, que são fisiologicamente diferentes das raízes sadias. Tais organismos apresentariam maior desenvolvimento sobre raízes infectadas com *Meloidogyne*, estabilizando-se em populações mais baixas na ausência do nematóide.

As bactérias endofíticas ocupam um nicho ecológico semelhante aos ocupados pelos patógenos, por isso apresentam grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos (Hallman *et al.*, 1997; Klopper, 1992; Misaghi & Donndelinger, 1990).

2.2 Mecanismos do controle biológico

Os mecanismos que as bactérias endofíticas utilizam para atuarem como agentes de biocontrole incluem produção de agentes antifúngicos ou antibacterianos (Lambert *et al.*, 1987; Maurhofer *et al.*, 1992), produção de sideróforos (Duijf *et al.*, 1993; Kloepper *et al.*, 1980), competição por nutrientes (Kloepper *et al.*,

1980), e indução de resistência sistêmica ou imunidade (Chen *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1995a,b).

Entre os mecanismos utilizados pelas bactérias para promover o controle de fitopatógenos, a indução de resistência sistêmica é a que vem despertando maior interesse. Entre os microrganismos que promovem a indução de resistência sistêmica estão, principalmente, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, representadas pela sigla PGPRs (Koepper *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 2001). As rizobactérias são bactérias que colonizam as raízes das plantas e aquelas que exercem efeito benéfico no desenvolvimento das plantas por meio de promoção do crescimento e bioproteção contra fitopatógenos são chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Dentre os mecanismos ativados pelas PGPRs podem ser citados a produção de PR proteínas, o acúmulo de lignina, calose, compostos fenólicos e fitoalexinas (Mariano *et al.*, 1998).

A indução de resistência é definida como um aumento da capacidade de defesa das plantas sobre vários patógenos e pragas, adquirido após uma estimulação apropriada, e a resistência resultante de um agente indutor sobre a infecção de um patógeno é chamada de resistência sistêmica induzida (ISR) ou resistência sistêmica adquirida (SAR) (Ramamoorthy *et al.*, 2001). O agente indutor pode ser uma substância química ou microrganismo (Kloepper *et al.*, 1997). Como ativador químico pode-se citar os derivados benzotiadiazólicos e outros compostos (Oka, 1999; Shah *et al.*, 1997), extratos de células de microrganismos (Leeman *et al.*, 1995; Pascholati, 1998) ou microrganismos vivos (Hoffland *et al.*, 1996; Kloepper *et al.*, 1997; Pascolati, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Em muitos casos, a SAR envolve a expressão de um grupo

de genes, incluindo aqueles que codificam enzimas e proteínas relacionados à patogenicidade (PR) proteínas (Sticher, 1997).

Estudos recentes indicam que as plantas possuem diversos mecanismos de defesa latentes, que conferem proteção quantitativa contra uma variedade de microrganismos. Esses mecanismos tornam-se ativos quando expostos a stress, infecção por fitopatógenos ou outros microrganismos (Benhamou, 1996).

Dentre os mecanismos bioquímicos de defesa das plantas tem-se as proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), das quais as mais comumente estudadas são PR-1, PR-2 (β -1-,3-glucanase), PR-3 (quitinases) e PR-5 (osmotina). Elas acumulam-se em locais de infecção e em sítios distantes destes, em casos de indução de resistência sistêmica (Sticher *et al.*, 1997). As enzimas β -1-,3-glucanase e quitinase foram induzidas local e sistematicamente após aspersão de folhas de café com suspensão de *Bacillus thuringiensis*, que induziu resistência sistêmica contra *Hemileia vastratix* (Guzzo & Martins, 1996).

Chen *et al.* (1995) verificaram que a aplicação de bactérias endofíticas através de injeção no caule de plantas de algodão reduziu a podridão de raízes causado por *Rhizoctonia solani* e murcha vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Benhamou *et al.* (1998), tratando sementes de tomate com a bactéria endofítica *Bacillus pumilus* linhagem SE 34, controlaram o fungo vascular *F. oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*, cujo micélio teve o crescimento restrito à epiderme.

As peroxidases também são importantes nas reações de defesa das plantas, pois a lignificação e o espessamento da parede celular são respostas bem

conhecidas no ataque de patógenos (Vance, 1980). Reitz *et al.* (2001) observaram resistência sistêmica induzida em batata contra o nematóide *Globodera pallida*, tendo como agente indutor a rizobactéria *Rhizobium etti* linhagem G12, e verificaram que o aumento da atividade de peroxidase ocorreu somente após a inoculação do nematóide *Globodera pallida* e a atividade da peroxidase foi associada com aumento da lignificação da parede celular.

Alguns microrganismos endofíticos possuem capacidade de modificar morfológicamente os tecidos do hospedeiro, acarretar modificações fisiológicas e proteger as plantas contra o ataque de insetos ou patógenos (Azevedo, 1998). Vários fatores favorecem o potencial de agentes de ISR das bactérias endofíticas, pois elas possuem uma natural e íntima associação com as plantas (Ramamoorthy, 2001). O tecido interno das plantas é ambiente de relativa uniformidade e proteção, favorecendo as bactérias endofíticas quando comparadas com as ectofíticas, que estão sujeitas à competição por nutrientes com outros microrganismos e flutuações de temperatura do ambiente (Chen *et al.*, 1995).

A extensa e freqüente ocorrência de populações semelhantes de bactérias endofíticas parece indicar que plantas saudáveis transportam populações de bactérias endofíticas, assim, o interior das plantas representam um nicho ecológico vasto e relativamente desconhecido desses organismos. Ainda assim, a ocorrência de comunidades de bactérias endofíticas, embora regularmente identificadas, tem recebido relativamente pouca atenção (Chanway, 1995).

A maioria das bactérias selecionadas com potencial para agentes de controle biológico são rizobactérias. Infelizmente, a maioria desses agentes de

biocontrole não correspondeu às expectativas iniciais, e esse fracasso tem sido atribuído à fraca capacidade da rizosfera e às dificuldades associadas com a instabilidade das bactérias no longo ciclo da cultura (Schroth *et al.*, 1982; Weller, 1988). Contudo, a íntima relação entre bactérias endofíticas e seus hospedeiros fazem delas candidatas para seleção de agentes de biocontrole (Chen *et al.*, 1995).

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias endofíticas de raízes de cafeeiro e avaliar sua capacidade de controlar *in vitro* o nematóide *Meloidogyne incognita*, a mais daninha espécie de nematóide parasito do cafeeiro no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção do inóculo de nematóides

O nematóide utilizado foi *Meloidogyne incognita*, isolado de raízes de cafeeiro (sítio do Trevo, município de Osvaldo Cruz, SP) e mantido em tomateiro em casa de vegetação. Determinou-se que o isolado pertencia à raça 2 através do Teste Padronizado de Hospedeiro Diferenciais (Taylor & Sasser, 1978). Os nematóides utilizados no experimento foram extraídos das raízes de tomateiro pelo método de Coolen e D'Herde (1972) e seguido pelo método de Baermann modificado pelo uso de recipiente raso (Southey, 1986). O inóculo, constituído de juvenis de segundo estágio, foi calibrado antes da inoculação através de contagem em microscópio óptico em lâmina de contagem de Peters.

3.2 Coleta do material vegetal para isolamento de bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas foram isoladas no laboratório de Microbiologia da Embrapa – Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP. Foram retiradas amostras de tecidos vegetais (folhas, ramos e raízes) de plantas aparentemente saudáveis de

café, coletadas em três diferentes regiões geográficas e climáticas do estado de São Paulo (municípios de Mococa, Pedreira e Pindorama). Como o número de isolados de bactérias endofíticas obtidos foi muito grande, preferiu-se para fins de estudo neste trabalho o uso apenas de bactérias coletadas nas raízes, levando-se em conta que os nematóides do gênero *Meloidogyne* afetam as raízes dos cafeeiros e as bactérias isoladas dessa região da planta provavelmente terão melhores condições de realizar o controle biológico.

As amostras foram coletadas de três plantas em cada local de coleta. As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas e transportadas ao laboratório.

3.3 Isolamento de bactérias endofíticas

As raízes foram submetidas a lavagem em água corrente para eliminar o solo aderido e reduzir o número de microrganismos epífitos. Em câmara de fluxo laminar as amostras foram desinfetadas com álcool 70 % por 10 minutos, solução de hipoclorito de sódio 3 % por 20 minutos e álcool 70 % por 30 segundos, seguida de duas lavagens em água destilada esterilizada para retirar o excesso de álcool.

Os tecidos vegetais já desinfetados foram cortados em pedaços menores (aproximadamente 0,5 cm²), em seguida colocados em placas de Petri (sete fragmentos por placa) contendo os meios de cultura TSA 10 % suplementados com ciclohexamida (50 µg/ml), para inibir o crescimento de fungos, e incubadas a 28 °C por 48 horas. Após 48 horas de incubação, as colônias que iam crescendo foram repicadas

em meio TSA, por meio de estrias de esgotamento, para a obtenção de colônias isoladas. Posteriormente as colônias foram transferidas para tubos com meio TSA inclinado.

Para verificar se o processo de desinfecção foi eficiente, plaquearam-se em meio de cultura TSA (“Tryptone Soya Agar”) alíquotas de 0,1 mL da água destilada esterilizada usada na última lavagem, após a desinfecção das amostras. Não havendo crescimento bacteriano dentro de 48 horas, os isolados obtidos foram considerados endofíticos.

3.4 Produção do inóculo bacteriano

Os isolados de bactérias endofíticas preservados em tubos de ensaio com meio inclinado TSA foram transferidos para placas de Petri contendo meio TSA e incubados a 28 °C em câmara de BOD. Após o crescimento das bactérias, as suspensões foram obtidas, adicionando-se às placas solução salina de MgSO_4 0,1 M e homogeneizado com auxílio de alça de Drigalsky. A concentração das suspensões foi ajustada, em espectrofotômetro, para $T_{580\text{nm}} = 20 \%$.

3.5 Avaliação do efeito antagônico dos isolados das bactérias endofíticas (testes *in vitro*)

Todas as bactérias endofíticas isoladas do sistema radicular dos cafeeiros foram colocadas para crescer em placas com meio de cultura TSA. Inicialmente elas foram agrupadas pelas características morfológicas das colônias,

observando-se forma, borda, pigmentação, superfície e consistência, selecionando-se 54 consideradas diferentes, para serem testadas quanto ao potencial de controle de fitonematóides (TABELA 1).

Tabela 1. Plantas amostradas e códigos das bactérias endofíticas isoladas em plantas de café selecionadas para serem testadas como controle biológico de fitonematóides do gênero *Meloidogyne*

Planta amostrada	Códigos dos isolados
<i>Coffea arabica</i> Pedreira-SP	TR1Ile, TR1IIId, TR1Id, TR1IIIf, TR1Ig, TR1Ia, TR2IIId, TR2IIb, TR2IIg, TR3a, TR3Ie, TR3Ib, TR3IIb, TR3IIc, TR3Ib
<i>Coffea robusta</i> Mococa-SP	TR4IIId, TR4IIa, TR4Ib, TR5IIId, TR5Ia2, TR5IIa, TR5IIc, TR5Id, TR5Ic, TR5IId, TR5IIe2, TR6IIId, TR6IIe, TR6IIId1
<i>Coffea robusta</i> Pindorama-SP	TR7IIIB, TR7IIc2, TR7IIb, TR7Ib, TR7IE, TR7IIa, TR7IIa, TR7IIc1, TR7Ic, TR8IIa, TR8IIc, TR8IIId, TR8Id, TR8IIb, TR8IIa, TR9IIc, TR8IIE, TR9Ib, TR9IIb3, TR9Ia, TR9Ic, TR9IE, TR9IIE
<i>Coffea arabica</i> Pindorama-SP	TR10Ic, TR10Ib

Cerca de 400 juvenis de *Meloidogyne incognita*, tratados com sulfato de estreptomicina 0,1 % por 5 minutos e lavados em água destilada esterilizada, foram colocados em recipientes de vidro para cultura de tecidos (Magenta Corp.®, Chicago, EUA), com 5 cm de diâmetro e 6 de altura, contendo suspensão de cada bactéria isolada, meio de cultura TSB líquido e como testemunha vidros sem as bactérias, com cinco repetições para cada tratamento. Após 48 horas, os nematóides foram coletados em uma peneira de malha 500 (abertura de 0,025 mm) e recolhidos pela lavagem com água destilada estéril.

Em seguida os nematóides foram colocados sobre folha de papel extra-fino em folhas duplas sobre uma tela de plástico, sobre vidros relógios tipo siracusa com água destilada estéril. Os nematóides que atravessaram o papel e ficaram retidos na siracusa foram considerados indivíduos vivos (sobreviventes).

Após 48 horas, foi realizada a coleta dos nematóides, que foram em seguida mortos pelo calor (banho maria até atingir 60 °C) e fixados em formaldeído a 2 %. Posteriormente avaliou-se o número de nematóides que sobreviveram após exposição às bactérias, através de contagem em microscópio óptico em lâmina de contagem de Peters. A variável analisada foi a sobrevivência do nematóide. Após análise de variância, as médias de cada isolado foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância, com auxílio do *software* Sanest (Ciagri e Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/ USP, Piracicaba, SP).

Foram feitos oito experimentos, cada um deles com quatro a dez diferentes isolados. O número de isolados testados em cada experimento foi função da disponibilidade de inóculo de *M. incognita*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Foram isoladas 161 bactérias endofíticas das raízes de cafeeiros aparentemente sadios (TABELA 2), demonstrando a eficácia da técnica empregada. Diversos trabalhos têm demonstrado a ocorrência de bactérias endofíticas em plantas. Naves (2000), isolando bactérias endofíticas do sistema radicular de diferentes espécies de plantas, obteve 81 isolados de bactérias endofíticas, sendo 22 a partir do sistema radicular de plantas de braquiária, oito de crotalária, 26 de milho, sete de pimentão, dois de cravo de defunto, 11 de tomateiro e cinco de trigo.

As bactérias endofíticas também podem ser isoladas de outras partes da planta. Yamada (1999) detectou microrganismos endofíticos no fruto de café e bactérias endofíticas na semente, especulando que a presença desses microrganismos pode afetar negativa ou positivamente a expressão final da qualidade da bebida do café.

As bactérias endofíticas também podem ser encontradas em caules e folhas. Zinniel (2002) isolou de caules e folhas 734 bactérias de quatro culturas, sendo 17 de soja (*Glycine max*), 353 de sorgo (*Sorghum bicolor*), 28 de trigo e 336 de milho. Hallmann *et al.* (1998), avaliando a interação entre bactérias endofíticas e o nematóide

Meloidogyne incognita, conseguiu isolar 29 espécies diferentes de bactérias em raízes de algodão afetadas pelo nematóide.

Tabela 2. Planta amostrada e códigos das bactérias endofíticas isoladas em plantas de café em 3 regiões do Estado de São Paulo

Planta amostrada	Códigos dos isolados
<i>Coffea arabica</i> Pedreira-SP	TR1Ile, TR1IIId, TR1IID, TR1Ib, TR1IIla, TR1IIlg, TR1Id, TR1IIIf, TR1IIId, TR1Ig, TR1IIc, TR1Ic, TR1Ia, TR1IIa, TR1If, TR1IIIf, TR1IIb, TR2IIc, TR2Ic, TR2IIId, TR2Ic, TR2IIa, TR2IIb, TR2Ib, TR2Ilg, TR3a, TR3Ie, TR3Ib, TR3IIa, TR3Ib, TR3Ic, TR3Id, TR3Ij, TR3Ic, TR3Ib, TR3If
<i>Coffea robusta</i> Mococa-SP	TR4Ib, TR4If, TR4Id, TR4Ie, TR4Ia, TR4IId, TR4Ic, TR4IIb, TR4IIId, TR4IIa, TR4Ib, TR5IIId, TR5IIb, TR5Ia2, TR5IIa, TR5Ia1, TR5Ie1, TR5Ib, TR5IIc, TR5Id, TR5IId, TR5Ib, TR5Ic1, TR5Ic, TR5IId, TR5Ie, TR5Ie2, TR6IId, TR6IIId, TR6IIc, TR6Ia, TR6Ie, TR6IIId, TR6IIa, TR6Ib, TR6IIb, TR6IIId2, TR6Ib, TR6Ie, TR6Ile, TR6Ic, TR6IIa
<i>Coffea robusta</i> Pindorama-SP	TR7IIb, TR7Ic2, TR7IId, TR7IIId, TR7Ib, TR7Ib, TR7IIc1, TR7IE, TR7IIa, TR7IIId, TR7IIa, TR7IIc, TR7IIc1, TR7Ic, TR7Ia, TR8IE, TR8IIE, TR8IIa, TR8Ic, TR8IIId, TR8Ic, TR8Ib, TR8Id, TR8IIE, TR8IId, TR8IIb, TR8IIc, TR8IIa, TR8Ia, TR9IIc, TR9IIE, TR9IIa, TR9Ib, TR9IIb3, TR9IId, TR9Ia, TR9Ic, TR9Ic, TR9IE, TR9IIb, TR9IIId, TR9Ib, TR9IIa, TR9IIE
<i>Coffea arabica</i> Pindorama-SP	TR10IIId, TR10II, TR10IE, T10Ic, TR10IIE, TR10Ic, TR10Ia, TR10IId, TR10Ib, TR10Ib, TR10IE, TR10Ic, TR10Id, TR10IIa, TR10IIa, TR11IIa, TR11Ia, TR11Ib, TR11Ic, TR11Ic3, TR11IId, TR11Ic, TR11Id, TR11IIId, TR11IIb, TR11Ib, TR11IIa, TR11IIE, TR11IE, TR12Ia, TR12IIc, TR12IIa1, TR12Ib, TR12IIb, TR12IIa, TR12IIa, TR12IIa

4.2 Avaliação do efeito antagônico dos isolados das bactérias endofíticas (testes *in vitro*)

Das 161 bactérias endofíticas isoladas (TABELA 2), 54 bactérias foram testadas quanto ao potencial de controle biológico com *M. incognita*, das quais 23 reduziram a sobrevivência do nematóide (TR1Ilg, TR5IIId, TR9IIc, TR1IIId, TR3IIb, TR1IIe, TR1Id, TR5Ia2, TR5Id, TR4IIa, TR7IIb, TR8IIc, TR8IIId, TR3a, TR7IIa, TR7IIb, TR8IIb, TR8IIa, TR9IE, TR9IIIE, TR9IIb3, TR10Ib, TR9IIc) em relação à testemunha (TABELAS 3, 4, 5 ,6, 7, 9 e 10). Acredita-se que o efeito desses isolados bacterianos seja devido à produção *in vitro* de substâncias que causam morte ou afetam a motilidade de *M. incognita*, embora essas substâncias não tenham sido determinadas.

Tabela 3. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no primeiro ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR1Ilg	18,63 c
TR1Ia	33,33 ab
TR5IIId	24,48 bc
TR4IIId	27,38 abc
TR2IIg	42,13 a
Controle	40,42 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância

Tabela 4. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no segundo ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR1IIe	15,88 cd
TR1IIId	21,50 bcd
TR1Id	23,50 bc
TR1IIIf	25,25 bcd
TR2IIId	29,13 ab
TR3Ie	28,75 ab
TR3Ib	24,13 abc
TR3IIb	20,88 bcd
TR3IIc	29,88 ab
TR9IIc	23,50 bc
Controle	34,00 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Tabela 5. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no terceiro ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR5IIId	45,25 ab
TR4Ib	38,75 ab
TR5Ia2	34,25 b
TR5IIc	46,73 ab
Controle	50,38 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Tabela 6. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no quarto ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR5IIa	43,28 a
TR7IE	33,62 a
TR7IIc2	38,13 a
TR6IIId1	38,00 a
TR5IIe2	35,25 a
TR5Ic	36,88 a
TR3Ib	33,75 a
Controle	47,88 a

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Tabela 7. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no quinto ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR4IIa	20,50 c
TR7IIb	31,50 bc
TR6IIe	40,75 ab
TR5Id	37,13 b
TR7IIa	38,13 ab
Controle	50,75 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Tabela 8. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no sexto ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria	Porcentagem (%) de
endofítica	nematóides sobreviventes
TR8IIc	20,13 cd
TR7IIIc1	33,38 a
TR8IIId	22,00 bcd
TR7IIa	23,38 bcd
TR7Ic	28,25 abc
TR7IIb	18,00 d
TR7Ib	28,62 abc
TR6IIId	30,25 ab
TR2IIb	27,50 abc
TR3a	22,87 bcd
Controle	34,75 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Tabela 9. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no sétimo ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria	Porcentagem (%) de
endofítica	nematóides sobreviventes
TR9Ia	46,50 a
TR8Id	41,13 ab
TR9Ib	39,00 ab
TR8IIa	33,12 bc
TR8IIb	29,50 c
TR8IIa	25,75 c
Controle	38,25 b

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância

Tabela 10. Porcentagem média de *Meloidogyne incognita* que sobreviveram à exposição aos isolados bacterianos no oitavo ensaio *in vitro*

Isolado de bactéria endofítica	Porcentagem (%) de nematóides sobreviventes
TR10Ic	37,62 a
TR8IIE	34,12 a
TR9IE	22,50 b
TR9IIIE	22,25 b
TR9IIIb3	22,00 b
TR10Ib	19,50 b
TR9IIc	15,75 b
Controle	39,50 a

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de significância.

Outros autores também já relataram controle de nematóides através de bactérias, Carneiro *et al.* (1998) testaram o efeito *in vitro* de vinte e um isolados de *Bacillus* spp. sobre juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*. Os mais eficientes foram *Bacillus thuringiensis brasiliensis* e *B. lateosporus*; tanto a cultura pura como o sobrenadante mataram J₂ recém eclodidos após 24 e 48 horas de exposição. Por outro lado, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis morrisoni* e *B. circulans* causaram apenas imobilização ou redução de movimento do nematóide.

Posteriormente, Naves (2000), utilizando filtrados de 40 isolados de bactérias endofíticas em testes *in vitro*, observou que os filtrados afetaram a motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Dois dos isolados

proporcionaram mortalidade acima de 90 %, quando os juvenis foram expostos por 48 horas. Posteriormente, em testes *in vivo*, os 40 isolados reduziram significativamente o número de galhas por grama de raízes, variando entre 18,79 % e 58,68 %.

Outro trabalho que demonstra o controle de fitonematóide foi realizado por Munif *et al.* (2000), que testaram 15 isolados de bactérias endofíticas em plantas de tomate e verificaram que quatro isolados reduziram significativamente o número de galhas de *M. incognita*.

Hallmann *et al.* (1995) também testaram bactérias endofíticas para verificar o controle de *M. incognita* e, de um total de 72 isolados de bactérias endofíticas isoladas de raízes de algodão e pepino, oito deles reduziram em 50 % a infecção de *M. incognita* em pepino. Bactérias isoladas por Krechel *et al.* (2002) de batata também se mostraram antagonistas a *M. incognita*. Das 440 bactérias isoladas, nove mostraram atividades antagonista contra o nematóide, bem como contra os fungos *Verticillium dahliae* e *Rhizoctonia solani*.

No estudo de controle biológico de patógenos, os testes *in vivo* são necessários para confirmar os resultados *in vitro*, pois mesmo se em laboratório um possível antagonista possa apresentar resultado negativo, em condições de campo ele poderá encontrar condições favoráveis para sua ação. Inversamente, microrganismos que se apresentam como possíveis antagonistas, quanto testados *in vitro*, podem mostrar-se neutras em condições de campo. Samac & Kinkel (2001), testando isolados de *Streptomyces spp.* com duas linhagens (93 e 63) produtoras de antibióticos *in vitro* e duas linhagens mutantes (96M6 e 63M2) não produtoras de antibiótico *in vitro*, observaram que todas as linhagens reduziram significativamente, a densidade

populacional de *Pratylenchus penetrans* em raízes de alfafa (*Medicago sativa*), tanto de cultivares resistentes como de suscetíveis. Segundo os autores a produção de compostos inibitórios *in vitro* para os nematóides não podem ser correlacionados com a produção *in vivo*. Existem vários mecanismos possíveis para a supressividade dos nematóides, as linhagens podem produzir componentes que diretamente afetam os nematóides, ou induzem resistência na planta hospedeira. As linhagens podem também ser metabolizadas de exsudados radiculares ou outro componente associado à raiz que seja atrativo ao nematóide, ou ainda, podem reduzir o espaço disponível para a alimentação dos nematóides.

Os resultados verificados neste trabalho indicam que vinte e três bactérias demonstram potencial para controle biológico de *M. incognita*, embora os resultados sejam preliminares, necessitando ser complementados com testes em casa de vegetação e com estudos para determinação do mecanismos de ação das bactérias. As bactérias endofíticas demonstram grande capacidade para serem utilizadas como controladoras de nematóides, resultados já demonstrados por diversos autores. Novos estudos nessa linha de pesquisa devem ser realizados para que o modo de ação das bactérias endofíticas sejam conhecidos, facilitando o seu uso em grande escala no controle de nematóides.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos dão suporte às seguintes conclusões:

- Existe associação de bactérias endofíticas com raízes de cafeeiro.
- Grande parte das bactérias endofíticas presentes em raízes de cafeeiro apresenta efeito antagônico *in vitro* sobre *Meloidogyne incognita*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e identificação de microrganismos endofíticos de 11 porta-enxertos de *Citrus* spp. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20, Piracicaba. 1995. **Anais**. Piracicaba: Esalq, 1995. p.114.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998, p.117-137.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultra structure and cytochemistry of the host response. **Planta**, n.204, p.153-168, 1998.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1, p.717-728.

CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; BRIDGE, J; SIKORA, R. (Ed). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB Internacional, 1990, p.387-430.

CARNEIRO, R.M.D.G.; SOUZA, I.S.; BELARMINO, L.C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.22, n.1, p.12-21, 1998.

CHANWAY, C.P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Microbiology**, n.74, p.321-322, 1995.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, n.5, p.129-191, 1995.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 1972. 77p.

DALLA PRIA, M. Controle Biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados. Viçosa, 1992. 101p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, n.105, p.1139-1147, 1994.

DUIJFF, B.J.; MEIJER, J.W.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Siderophore mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Netherlands Journal Plant Pathathology**, n.99, p.277-289, 1993.

DUPONNOIS, R.; B.A., A.M.; MATEILLE, T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. **Nematology**, v.1, n.1, p.95-101, 1999.

FREITAS, L.G.; CARNEIRO, R.M.D.G. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L.(Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.2, p.91-123.

GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR JUNIOR, G. O.; Jasson, H. G. **Disease of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.2, p.3-38.

- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastratix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v.144, p.449-459, 1996.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. *In vivo* and *in vivo* control of *Meloidogyne incognita* with culture filtrates from non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on tomato. **Journal of Nematology**, v.26, p.102, 1994.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, n.102, p.155-162, 1996.
- HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.551-560, 1999.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, n.7, p.925-937, 1998.
- HEBBAR, K.P.; ATKINSON, D.; TUCKER, W.; DART, P.J. Supression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. **Soil biology & Biochemistry**, n.24, p.1009-1020, 1992.
- HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; van PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas species*. **Phytopathology**, v.86, p.757-762, 1996.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal Botany**, n.63, p.1262-1265, 1985.
- JANSSON, H.B; TUNLIB, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. In: ANKE, T. (Ed.). **Fungal biotechnology**. Weinheim: Chapman and Hall, 1997. p.38-50.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v.42, n.9, p.692, 1964.

JUNG, C.; CAI, D.; KLEINE, M. Engineering nematode resistance in crop species.

Trends In Plant Science, v.3, n.7, p.266-271, 1998.

KERRY, B.R. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.22, n.4, p.621-631, 1990.

KLOEPPER, J.W.; WEI, G.; TUZUN, S. Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth – promoting rhizobacteria wich induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In: TJAMOS, E. S. (Ed.). **Biological Control of Plant Diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p.185-191.

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

KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G.W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance – historical precedence. **Phytopathology**, v.87, n.2, p.136-137, 1997.

KRECHEL, A.; FANPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) chitwood). **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.9, p.772-786, 2002.

- LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120, 1996.
- LAMBERT, B.; LEYNES, F.; VAN ROOYEN, L.; GOSSELÉ, F.; PAPON, Y.; SWINGS, J. Rhizobacteria of maize and their fungal activities. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.1866-1871, 1987.
- LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBEOEK, M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lypopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.85, p.1021-1027, 1995.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995a.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85, p.695-698, 1995b.

- LORDELLO, A.I.L.; LORDELLO, R.R.A. Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 13. Garça, 2001. **Anais**. Piracicaba, Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 91.
- LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. In: LUZ, W.C.DA; FERNÁNDEZ, J.M.; PRSTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas** . Passo Fundo: RAPP, 1996. p.1-49
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6, Rio de Janeiro, 1994. **Anais**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p. 345.
- MAURHOFER, M.; KEEL, C.; SCHNIDER, U.; VOISARD, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity. **Phytopathology**, v.82, p.190-195, 1992.
- MISAGLI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom – free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, n.9, p.808-811, 1990.
- MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied Environmental Microbiology**, v.32, p.694-698, 1976.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Evaluation of the biocontrol activity of endophytic bacteria from tomato against *Meloidogyne incognita*. **Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent.**, v.65 (2b), p.471-480, 2000.

NAVES, R. de L. Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides. Lavras, 2000. 113p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.

NOVARETTI, W.R.T. Controle biológico de nematóides fitopatogênicos. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1, Campinas, 1986. **Anais**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1986. p.24-38.

NOVARETTI, W.R.T. Controle biológico de nematóides. **Informe Agropecuário**, v.15, n.167, p.63-72, 1991.

OKA, Y.; COHEN, Y.; SPIEGEL, Y. Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- β -Amino-*n*-Butyric Acid. **Phytopathology**, v.89, n.12, p.1138-1143, 1999.

PARKE, J.L.; RAND, R.E.; JOY, A.E.; KING, E.B. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* of *P. fluorescens* to seed. **Plant Disease**, n.75, p. 987-992, 1991.

PASCHOLATI, S.F. Potencial de *Saccharomyces Cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PATRIQUIN, D.G.; DORING, A; BEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, n.24, p.734-742, 1978.

PERSSON, C.; JANSSON, H.B. Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode-trapping fungi. **Journal of Nematology**, v.31, n.2, p.164 –171, 1999.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, V.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, n.20, p.1-11, 2001.

REITZ, M.; HOFFMANN-HERGARTEN, S.; HALLMANN, J.; SIKORA, R.A.

Inductiona of systemic resistance in potato by rhizobacterium *Rhizobium etti* strain G12 is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins and enhanced lignin biosynthesis. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.108, n.1, p.11-20, 2001.

RIBEIRO, R.C.F. Avaliação da eficiência de isolados de *Monacrosporium* spp. no controle de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. Viçosa, 1999. 87 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

SAMAC, D.A.; KINKEL, L.L. Supression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfafa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, n.235, p.35-44, 2001.

SANTOS, M.A. Estudo de alguns fungos endoparasitos e predadores no controle de fitonematóides. Viçosa, 1996. 166p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

SASSER, J.N. Root-knot nematodes: A global menace to crop production. **Plant Disease**, v.64, p.36-41, 1980.

SHAH, J.; TSUI, F.; KLESSIG, D.F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (SAI 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.10, p.69-78, 1997.

SOUTHEY, J.F. Laboratory methods or work w ith plant and soil nematodes. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986, 202 p. (Technical Bulletin, 2).

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, n.35, p.235-270, 1997.

STIRLING, G.R. Biological Control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Disease Control and Pest Management**, v.74, n.1, p.55-60, 1984.

TAMAYO, G.Y. **Los nematodos enemigos de la agricultura**. Venezuela: UCV, 219p. 1972.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: Cooperative Publication, Department of Plant Pathology - North Carolina State University and United States Agency of International Development, 1978. 111p.

- THOMSON, J.A. Biological control of plant pests and pathogens: alternative approaches. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss, 1992, p.275-290.
- VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.
- VANCE, C.P. Rhizobium infection and nodulation : a beneficial plant disease? **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.399-424, 1983.
- WEISCHER, B.A. Where to go in phytonematode control? **Phytoparasitica**, v.22, n.2, p.95-99, 1994.
- WEICHER, B.; BROWN, D.J.F. Conhecendo os nematóides: Nematologia geral. Trad. Ferraz, L.C.C.B. Moscou: Pensoft, 2001. 209 p
- YAMADA, C.M. Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café. Viçosa, 1999. 56p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2198-2208, 2002.