



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO

ACTINOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM MUDAS DE TOMATEIRO

JOSILDA CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2011

**ACTINOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM MUDAS DE TOMATEIRO**

**JOSILDA CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Fermino Soares**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

D155 Damasceno, Josilda Cavalcante Amorim.  
Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de tomateiro / Josilda Cavalcante Amorim Damasceno. \_ Cruz das Almas-Ba, 2011. 95f; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Tomate – Cultivo. 2. Tomate – Nematóides em plantas – Biocontrole.  
I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 635.642

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
JOSILDA CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO**



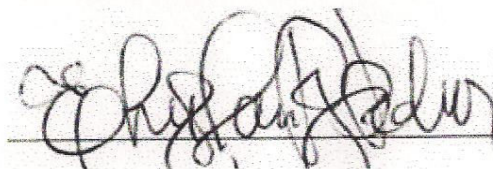
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Fermino Soares

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB  
(Orientadora)



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Silva Sousa

Bolsista PRODOC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias -UFRB



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elvira Maria Régis Pedrosa

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências  
Agrárias em .....  
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em .....

**A todos que acreditaram na minha capacidade de superar os meus limites e dar a volta por cima. Com carinho especial, eu dedico esta Dissertação ao amor da minha vida, companheiro carinhoso e eterno namorado, Renato.**

**DEDICO**

**Ao meu amado filho Alisson que tanto amo**

**OFEREÇO**

## Agradecimentos

Ao meu Deus Todo Poderoso por ter mim proporcionado à vida e a conquista de mais uma vitória;

Aos meus pais Geremias e Crispina pelo amor e incentivo aos estudos;

As minhas irmãs Geilza, Juciclea, Jailda e meu amado irmão Hélder pela amizade;

Ao meu eterno amado Renato pelo apoio, companheirismo e pela incansável ajuda na condução dos experimentos, incentivo na luta diária e exemplo de força e persistência;

Ao meu precioso filho Alisson, presente de Deus para minha vida;

Aos meus sogros Raimundo e Alaíde e todos os cunhados (as) pelo apoio e incentivo;

À Prof<sup>a</sup> Ana Cristina Fermino Soares, pela orientação, paciência, disposição em ajudar e por confiar na minha capacidade de desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. José Mauro, pesquisador da Embrapa pela amizade e identificação dos nematoídes;

À Dr<sup>a</sup> Cecília, pesquisadora da Embrapa pela amizade e fornecimento dos nematoídes;

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao Dr. Marlon, pelas sugestões que mim ajudaram a concretizar este trabalho;

A Dr<sup>a</sup> Carla Sousa, pela amizade, apoio e colaboração neste trabalho;

A técnica do laboratório Zozilene (meus braços) pela confiança, profissionalismo, amizade e por estar sempre pronta a ajudar;

A técnica do laboratório Nara pela amizade e colaboração nos trabalhos;

Aos doutorandos Jefferson, Jurema e Augusto pela amizade, sugestões e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do laboratório (Lica, Márcia, Cristiano, Carol, Carol Yamamoto, Cris, Ana Cláudia, Rafael, Darci, Nailson, Marcão) pelo convívio e amizade;

A Jucimara pela amizade, companheirismo e confiança;

As colegas do curso de Microbiologia Agrícola pela amizade;

A Liliane, Rosiane e Milene pela amizade e pelo apoio na condução dos trabalhos;

Aos colegas Jack Leite, Neiliane, Erasto e Luciano pela amizade e apoio na condução final dos trabalhos;

Aos colegas de Curso de Ciências Agrárias (turma 2009) pelo carinho;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação pelo apoio;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de crescer profissionalmente;

A FAPESB inicialmente e posteriormente a CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa do Mestrado;

Em fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na condução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos

## SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01

### Capítulo 1

ACTINOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO.....	20
---	----

### Capítulo 2

POTENCIALIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS NO BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM MUDAS DE TOMATEIRO.....	52
---	----

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
---------------------------	----



# ACTINOBACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM MUDAS DE TOMATEIRO

**Autor:** Josilda Cavalcante Amorim Damasceno

**Orientador:** Ana Cristina Fermino Soares

**RESUMO:** O tomateiro é uma importante hortaliça cultivada no Brasil. Contudo, problemas causados por fitonematoides provocam perdas na produção. As actinobactérias apresentam características importantes para o controle biológico e promoção de crescimento de plantas. Este trabalho teve os seguintes objetivos: realizar a caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias; avaliar o potencial desses isolados na promoção de crescimento de mudas de tomateiro e o seu potencial no biocontrole de *Meloidogyne javanica*. Dos 42 isolados de actinobactérias testados, 92,85%, 92,85%, 71,43%, 35,75% e 78,57% apresentaram atividade lípidica, celulolítica, quitinolítica, xilanolítica e de produção de ácido indolacético, respectivamente. No primeiro experimento, foram verificados incrementos de 19,6% e 76,0% no diâmetro do caule e massa seca das raízes das mudas de tomateiro cultivadas no substrato Vivatto Slim® infestado e incubado com as actinobactérias. A quantificação das actinobactérias no substrato e no solo, em todos os experimentos, aos 40 dias após infestação e incubação e após a coleta das mudas, revelaram densidades populacionais superiores ao tratamento testemunha para todos os isolados de actinobactérias. Houve aumento no teor de N da parte aérea das mudas de tomateiro, promovido por alguns isolados de actinobactérias, nos três experimentos. Entretanto, não houve efeito no teor de P. Nos testes *in vitro* com metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias, obteve-se alta taxa de mortalidade de J2 de *M. javanica*. A redução no número de galhas e massa de ovos foi de 62,2% e 76,4%, 73,7% e 72,8%, para as plantas cultivadas no substrato Vivatto Slim® e no solo, incubados e infestados com os isolados BFT 104 e BFT 4, respectivamente. O efeito na promoção de crescimento e no biocontrole depende do isolado de actinobactéria.

**Palavras-chave:** Controle biológico, *Solanum lycopersicum* L., *Streptomyces* spp.

# GROWTH PROMOTION AND CONTROL OF *Meloidogyne javanica* IN TOMATO PLANTS BY ACTINOBACTERIA

**Author:** Josilda Cavalcante Amorim Damasceno

**Advisor:** Ana Cristina Fermino Soares

**ABSTRACT:** Tomato is an important vegetable crop grown in Brazil. However, plant parasitic nematodes can cause severe yield losses. Actinobacteria present important characteristics for biological control and plant growth promotion. This study had the following objectives: to carry out the physiological characterization of actinobacteria isolates, to evaluate the potential of those isolates for growth promotion of tomato plants, and for biocontrol of *Meloidogyne javanica*. From a total of 42 isolates of actinobacteria tested, 92.85%, 92.85%, 71.43%, 35.75%, and 78.57% presented lipase, cellulase, chitinase, xylanase activity and production of indol acetic acid, respectively. In the first experiment, increments of 19.65% and 76.0% were obtained for stem diameter and root dry matter of tomato plants grown in Vivatto Slim® plant growth potting mix, infested and incubated with actinobacteria. For all experiments, quantification of actinobacteria in potting mix and in soil, revealed higher population densities for the inoculated treatments, compared to the uninoculated control treatment. Also, in all three experiments, there was an increase in leaf and stem N levels, as a result of the treatment with some actinobacteria isolates. However, there was no effect on plant P levels. In *in vitro* tests with secondary metabolites produced by actinobacteria showed high mortality rates for J2 of *M. javanica*. The reduction in the number of galls and egg mass was 62.2% and 76.4%, 73.7% and 72.8% for plants grown in Vivatto Slim® potting mix and in soil, infested and incubated with isolates BFT 104 and BFT 4, respectively. The effect on growth promotion and biocontrol depends on the actinobacteria isolate.

**Key-words:** Biological control, *Solanum lycopersicum* L. , *Streptomyces* spp.

## INTRODUÇÃO

### A cultura do tomateiro

O tomateiro é uma planta da classe dicotiledoneae, ordem Tubiflorae, pertencente à família Solanaceae, gênero *Lycopersicon*, sendo a espécie cultivada o *Solanum lycopersicon* L. (ALVARENGA, 2004). Segundo Rodriguez et al. (1984), é uma planta herbácea, anual, possuindo raiz pivotante. O caule é redondo, piloso e macio quando jovem. As folhas são alternadas, do tipo composta. A floração e a frutificação ocorrem juntamente com o crescimento vegetativo.

O tomateiro tem como prováveis centros de origem a região montanhosa dos Andes, o Norte do Chile, Bolívia, Equador, Peru e Colômbia. O México é considerado o centro de domesticação, onde a planta silvestre foi cultivada e melhorada geneticamente (FILGUEIRA, 2003). A cultura é considerada cosmopolita, uma vez que é bastante tolerante a variação dos fatores climáticos, podendo desenvolver-se em regiões de clima tropical de altitude, subtropical e temperado (SILVA et al., 1994).

A cultura desempenha importante papel na economia nacional, sendo um dos principais produtos olerícolas. O Brasil se destaca entre os oito países considerados como maiores produtores, tendo alcançado em 2008, a produção total de 3.867.655 milhões de toneladas de tomate (FNP, 2009). No Brasil, o tomateiro é amplamente cultivado, praticamente em todos os estados, mas sua produção destaca-se nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. O período de plantio é peculiar para cada região geográfica, em função das condições climáticas (FILGUEIRA, 2000). Os Estados com maior participação na safra nacional 2007-2008 foram Goiás (26,67%), São Paulo (22,29%) e Minas Gerais (13,37%) (FAOSTAT, 2008).

O tomate é uma hortaliça que faz parte da dieta alimentar diária da maioria da população brasileira, sendo uma das culturas mais importantes, não apenas em

produção, mas também em valor sócio-econômico. É a hortaliça mais industrializada, empregando grandes contingentes de mão-de-obra, com um mercado de derivados que explora principalmente a produção de extratos, molhos prontos e catchup (KROSS et al., 2001). É importante economicamente, pelo valor de produção e socialmente, pelos empregos diretos e indiretos que gera, e ainda pelo valor nutritivo, por ser rico em vitamina A, complexo B, glicose, frutose, lipídeo, proteína e sais minerais como: fósforo, cálcio, potássio e magnésio (MAKISHIMA, 2003).

### **Fitonematoides e seu impacto na cultura do tomateiro**

Os nematoides constituem o grupo de organismos pluricelulares mais abundantes no planeta, sendo estimados em um milhão de espécies (KIMPINSKI & STURZ, 2003; VIGLIERCHIO, 1991). São organismos aquáticos que vivem nas águas marinhas, águas doces e no filme de água do solo. A maioria é de vida livre, alimentando-se de micro-organismos, tais como bactérias (bacteriófagos), fungos (micetófagos ou micófagos), protozoários (protozoófagos) e nematoides (nematófagos). Geralmente são classificados segundo seu hábito nutricional. Dentre os grandes grupos de nematoides estão os fitonematoides, ou nematoides parasitas de plantas, que causam perdas econômicas significativas em uma grande variedade de culturas (FERRAZ & MONTEIRO, 1995).

Estes organismos alimentam-se e reproduzem-se em plantas vivas, podendo migrar para a região rizosférica, para dentro das raízes, ou em direção à parte aérea. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são considerados os mais importantes dentre a vasta gama de gêneros fitoparasitos por possuírem ampla distribuição geográfica e apresentarem extensa gama de hospedeiros, incluindo mais de 2000 espécies de plantas, dentre elas, diversas culturas de importância econômica e plantas espontâneas (PIO-RIBEIRO & ASSIS FILHO, 2005).

São muitos os fatores limitantes à produção de tomate no Brasil, com destaque para as doenças causadas por nematoides (SILVA et al., 2004), sendo esta cultura hospedeira de dezenas de espécies de nematoides. Só no Brasil existem 43 espécies de fitonematoides pertencentes a 21 gêneros associados à cultura do tomateiro, sendo que dois grupos apresentam sintomas típicos, que são as espécies do gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, que provocam galhas e lesões nas raízes, respectivamente (CAMPOS, 2000). As perdas na produção devido ao ataque de

nematoides às culturas vão desde danos leves a severos. Em termos mundiais, estima-se que as perdas anuais causadas por estes organismos em todas as culturas alcancem em torno de 100 bilhões de dólares (FREITAS et al., 2001).

As perdas variam de acordo com a época de plantio e com as práticas culturais adotadas pelos produtores. As espécies *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood são as mais comuns no país, estando presentes em todos os tipos de solo. Em menor intensidade, ocorre a espécie *M. hapla* Chitwood, que predomina em clima temperado ou em regiões com temperaturas entre 15 °C e 25 °C (LOPES & ÁVILA, 2005).

Os nematoides das galhas são endoparasitos sedentários, cujas fêmeas produzem em média, 500 ovos numa matriz gelatinosa, formando uma massa de ovos, na maioria das vezes, externamente à raiz. A injeção de secreções culmina com a hipertrofia e hiperplasia de células (células gigantes) acompanhadas normalmente pelo alargamento das raízes, formando galhas. A reprodução é frequentemente partenogênética (WHITEHEAD, 1997). Estes caracterizam-se por acentuado dimorfismo sexual: a fêmea apresenta o corpo globoso, piriforme ou em forma de saco, e imóvel e o macho tem corpo vermiforme. A penetração nas raízes ocorre no estágio juvenil vermiforme (J2), pela região meristemática, em seguida o juvenil migra até a zona de maturação, onde estabelece um local de alimentação na região vascular. Este passa por três ecdises até atingir a fase adulta. Os machos adultos abandonam o sistema radicular e as fêmeas adquirem corpo globoso, permanecem no interior das raízes, como endoparasitas sedentárias e deposita seus ovos no exterior da raiz. Os ovos que a fêmea lança para o exterior permanecem unidos por meio de uma matriz gelatinosa secretada pela própria fêmea durante a oviposição (COSTA, 2000).

Estes nematoides formam estruturas denominadas galhas no sistema radicular da planta interrompendo os vasos condutores, xilema e floema, ocasionando murcha das plantas durante os períodos mais quentes do dia, menor desenvolvimento das plantas, desfolha prematura sintomas de deficiência mineral, clorose, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes e menor crescimento da parte aérea, culminando em menor produção, comprometendo ou até mesmo inviabilizando o cultivo em áreas com infestações mais severas (TIHOHOD, 2000). A infecção também afeta as

relações água × planta e o processo fotossintético (MELAKEBERHAN, et al., 1986). Sintomas associados à infecção como destruição de pelos absorventes e redução da taxa de crescimento das raízes, limitam a exploração do solo e absorção de água e nutrientes, provocando o tombamento de plantas e as predispõem ao ataque de outros micro-organismos (DIAS & RIBEIRO JUNIOR, 2001).

A contaminação de áreas agrícolas por nematoides, bem como a sua disseminação para novas áreas, ocorre principalmente por água de irrigação ou de chuva, por solo aderido a máquinas agrícolas e por material propagativo infectado como mudas e sementes (AGRIOS, 1997).

Para o manejo destes parasitas, frequentemente se recorre ao controle químico que tem seu uso cada vez mais limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento, e baixa eficácia de controle depois de repetidas aplicações (DONG & HANG, 2006). Esforços têm sido concentrados na integração de agentes de controle biológico. O controle biológico, quando aplicado de forma correta, não contamina, não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006; BETTIOL, 2008).

## **Controle Biológico**

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente (BETTIOL, 2008). Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos o controle biológico tem sido uma das mais discutidas. O controle biológico tem se apresentado eficiente e viável para o manejo de várias culturas por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA 2005).

O controle biológico de patógenos é a total ou a parcial redução da população do patógeno por outros organismos, e ocorre rotineiramente na natureza (AGRIOS, 2004). Segundo Bettiol (1991), a doença na planta é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno, e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção,

apresentando potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para este autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

Cook & Baker (1993) definem controle biológico como a redução da intensidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença realizadas por meio de um ou mais organismos que não o homem. Nesta definição, segundo Junqueira e Gasparotto (1991), as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução do patógeno.

O termo organismos inclui indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas, bem como outros antagonistas aos patógenos. Este termo é utilizado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, devendo estes estar adaptados ecologicamente ao mesmo tecido das plantas ocupado pelos patógenos, mas sendo não patogênicos às mesmas (BETTIOL & GHINI, 1995). Melo & Azevedo (1998) definem o controle biológico como sendo o controle de um micro-organismo por outro micro-organismo.

O controle biológico visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL, 1991). Assim sendo, este método de controle inclui práticas culturais que promovem um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos; o melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de micro-organismos; a introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos benéficos (CARDOSO, 1978).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico é de fundamental importância para aumentar as vantagens competitivas no ambiente. Os principais mecanismos das interações antagonísticas entre micro-organismos incluem a competição, a antibiose e o micoparasitismo, além da indução de resistência do hospedeiro (MOORE-LANDECKER, 1996; TRONSMO & HJELJORD, 1998).

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) são capazes de induzir resistência sistêmica em plantas. A ISR (*Induced Systemic Resistance*) pode ser definida como um processo de defesa ativa da planta, em que esta utiliza múltiplos mecanismos induzidos sistemicamente por rizobactérias e que se apresenta eficiente contra uma variedade de patógenos de plantas (LUZ, 1996). Alguns dos mecanismos propostos para indução de resistência sistêmica em plantas por RPCPs incluem vários processos fisiológicos, tais como: aumento da produção das proteínas solúveis em ácido (ZDOR & ANDERSON, 1992), acúmulo de fitoalexinas (VAN PEER et al., 1991), lignificação (HOFFLAND & BIK, 1993), produção de ácido salicílico em baixa concentração de ferro (LEEMAN et al., 1995).

Outros importantes mecanismos de supressão de patógenos por rizobactérias são a produção de enzimas líticas que atuam na lise de células fúngicas, como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, que degradam a quitina e o glucano presentes nas paredes das células fúngicas e a degradação de toxinas produzidas pelos patógenos (BERG et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Dentre os agentes de controle biológico e promoção de crescimento de plantas, as actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentam um papel importante na rizosfera de plantas, por influenciarem o seu crescimento, colonizando as raízes e agindo contra fungos e bactérias fitopatogênicas, devido à produção de antibióticos e outros metabólitos secundários (COMPANT et al., 2005; RAUPACH & KLOEPPER, 1998).

### **Promoção de crescimento de plantas**

Bactérias associadas à rizosfera e colonizadoras de raízes de plantas podem promover efeitos benéficos às plantas, sendo estas denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Esse efeito benéfico das rizobactérias refere-se ao maior crescimento das plantas, refletido na altura, crescimento das raízes e parte aérea da planta, vigor e produtividade maiores, quando comparadas a plantas não associadas às RPCPs (BERTRAND et al., 2001; ROMEIRO & BATISTA, 2002).

Essas bactérias têm sido estudadas em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, citrus (*Citrus* spp.) (ARAÚJO et al., 2001; AMORIM & MELO, 2002), milho (*Zea mays* L.) (ARAÚJO et al., 2000), batata



(*Solanum tuberosum* L.) (REITER et al., 2002), trigo (*Triticum aestivum* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (ZINNIEL et al., 2002), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (SILVEIRA et al., 1995), cacaueteiro (*Theobroma cacao*) (SILVA, 2007); tomateiro (*Solanum lycopersicum*), (LIMA 2003; SOUSA et al., 2006; SOARES, 2010), bananeira (*Musa* spp.) (PAIXÃO, 2008), entre outras.

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias são complexos e podem ser influenciados por diversos fatores abióticos (temperatura, pH, radiação, umidade, íons e elementos minerais e orgânicos do solo) e bióticos (características do hospedeiro, presença de patógenos e outros micro-organismos associados à planta) (SILVEIRA, 2001; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; ARAÚJO et al., 2002). O estímulo ao crescimento vegetal por estas bactérias pode ser o resultado tanto de ações diretas, como o aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta e a produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal (SHISHIDO et al., 1999; STURZ et al., 2000), como de ações indiretas, a exemplo do controle de fitopatógenos por competição, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al., 1998; STURZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

Outro mecanismo de promoção de crescimento indireto dos vegetais é a antibiose, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm um efeito danoso sobre o outro, inibindo o crescimento de fitopatógenos ou inativando a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001). Contudo, a ação efetiva de um antibiótico contra uma população de um determinado fitopatógeno pode não ter a mesma eficiência sobre outra população da mesma espécie, pela existência de mecanismos genéticos de resistência, ou ainda por perda da eficiência devido a condições variáveis do ambiente (OLIVEIRA et al., 2003). Entre os antibióticos com propriedades de biocontrole já bem caracterizados, podemos citar as fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrina, piocianina, 2,4-diacetilfloroglucinol e cianeto de hidrogênio (RAMAMOORTHY et al., 2001; RAMETTI et al., 2003). São conhecidas produtoras de antibióticos, espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas fluorescentes*, *Streptomyces*, entre outros (MELO, 1998b).

As actinobactérias são também conhecidas pela sua importância nos processos de compostagem, devido à capacidade de produção de enzimas capazes

de degradar moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilanose e lignina (CRAWFORD, 1988).

### **Actinobactérias**

As actinobactérias, principalmente as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, compõem um importante grupo de bactérias do solo, pertencentes à classe Actinobactéria, família Streptomycetaceae, sendo Gram positivas, aeróbias estritas, cujas colônias são pequenas pulverulentas ou velutinas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades e produtores de pigmentos solúveis (ARAUJO, 1998). O ciclo de vida inicia-se com a germinação do esporo, dando origem a um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas de nutrientes como polissacarídeos (amido, pectina, quitina, celulose), proteínas (queratina, elastina), lipídeos e compostos aromáticos, pela ação de enzimas extracelulares. A partir deste micélio vegetativo (hifas primárias), desenvolve-se o micélio aéreo (hifas aéreas) no centro da colônia. As hifas podem apresentar-se multinucleadas ou em compartimentos mononucleados, que darão origem a cadeias de esporos. Nesta fase, ativam-se os metabolismos secundários, em que são produzidos, principalmente antibióticos e pigmentos (ARAUJO, 1998; PADILHA, 1998).

O gênero *Streptomyces* é o mais estudado entre as actinobactérias, sendo conhecido mundialmente pela capacidade de produção de antibióticos (PADILHA, 1998), enzimas líticas e pela decomposição da matéria orgânica, especialmente polímeros como lignocelulose, amido e quitina (GOODFELLOW, 1985; MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; GETHA et al., 2005). A produção de metabólitos secundários pelos actinobactérias tem sido associada à diferenciação na sua morfologia celular, tal como a produção de esporos, podendo ser limitada ou inibida por deficiências nutricionais.

A utilização de actinobactérias como organismos de controle microbiano é reforçada ainda pelo fato destas serem habitantes dos mais diversos tipos de solos (GAVA, 1998), sendo capazes de colonizar a rizosfera e produzir esporos, apresentando assim características desejáveis para o controle biológico de doenças de plantas (MOURA, 1996).

Além do efeito de biocontrole, estes micro-organismos têm um papel importante na decomposição da matéria orgânica e promoção de crescimento de plantas. Os mecanismos de ação responsáveis pela promoção de crescimento em plantas também podem estar ligados à inibição de patógenos, beneficiando o crescimento vegetal de forma indireta (ZAGO et al., 2000). Os efeitos diretos na promoção de crescimento de plantas ocorrem pela produção de substâncias promotoras de crescimento como giberelinas, auxinas e citocininas, que causam efeitos benéficos no crescimento de plantas como o desenvolvimento da parte aérea, aumento do crescimento de raízes e número de pêlos radiculares absorventes (CATTELAN, 1999; LUZ, 1996). Os efeitos indiretos ocorrem através da indução de resistência sistêmica (ROMEIRO, 1999), mineralização de nutrientes (SILVEIRA 2001), produção de antibióticos (FRAVEL, 1998), produção de enzimas (GLICK et al., 1995), produção de quitinase (GOMES et al., 2000), produção de sideróforos (WELLER, 1988), produção de ácido cianídrico (HCN) (LUZ, 1996), solubilização de fosfato (MELO, 1998) e fixação biológica de nitrogênio (GRIMES & MOUNT, 1984).

Entretanto, apesar do potencial destas actinobactéria e de sua importância nos sistemas de produção agrícola, trabalhos com *Streptomyces* spp. no solo e sobre os mecanismos de ação e do potencial de utilização destes micro-organismos, como insumo biológico na agricultura, com efeito na disponibilidade de nutrientes e promoção de crescimento vegetal, ainda são muito incipientes. Dentro deste contexto, existe a necessidade de se estudar a ação das actinobactérias no solo e em substratos orgânicos, seu impacto nas características químicas e biológicas dos substratos, na promoção de crescimento de plantas e controle de fitonematoides.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da infestação do solo e de substrato orgânico com isolados de *Streptomyces* spp., na promoção de crescimento e no controle de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press: 1997. 635 p.

AGRIOS, G.N. How pathogens attack plants. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, 2004, p.177-203.

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: Marco Antônio Rezende Alvarenga. (Org.). **Tomate, produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. 1 ed. Lavras-MG: Editora UFLA, 2004, p.13-23.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUIAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xilella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p.351-367.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.447-451, 2000.

BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E. M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium wilt*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1-10, 2000.

BERTRAND, H., NALIN, R., BALLI, R., CLEYET-MAREL, J. C. Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). **Biology and Fertility Soils**, v.33, p.142-156. 2001.

BETTIOL, W. Componentes do Controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico . In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.717-727, 1995.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção, In: Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N. (Eds). Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: **Panorama atual e perspectivas**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental, 2008. p.289-308.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.343-350, 2001.

CAMPOS, V.P. Doenças causadas por nematoides em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Ed) **Controle de doenças de plantas – Hortaliças**. Viçosa: UFV, Cap.23, p.801-841, 2000.

CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microorganismos. In: GALLI, F. (ed) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, SP, v.1. 1978. 373 p.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 139), 1999.

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

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**. St.Paul, 1993, 539p.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promotion bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4951-4959, 2005.

COSTA, D.C. **Doenças causadas por nematoides**. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p.66-77. 2000.

CRAWFORD, D.L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (Eds): **Actinomycetes in biotechnology**, s.1:s.n., 1988. p.433-459.

DIAS, M.S.C.; RIBEIRO JUNIOR, P.M. Nematoides na bananicultura. In: SIMPÓSIO NORTE MINEIRO SOBRE A CULTURA DA BANANA, 1., 2001, Montes Claros. Anais... Montes Claros: Unimontes, 2001. p.168-179.

DONG, L.Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**, v.288, p.31-45, 2006.

FAO-FAOSTAT Database Results. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 26 dez.2010.

FERRAZ, L.C.C.B., MONTEIRO, A.R. *Nematoides*. IN: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de fitopatologia** volume 1: *princípios e conceitos*. 3 ed. São Paulo: Ceres, p.168-201, 1995.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura**: cultura e comercialização de Hortaliças. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2000.v.2, 357p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2003. p.340-345.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **AGRIANUAL: Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2009. 520 p.

FRAVEL, D.R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.75-91, 1998.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa: Editora UVF, 2001, 84p.

GAVA, C.A.T. **Seleção de estreptomicetos para controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora***. 1998. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; WONG, W.H.; SEKI, T.; WARD, A.; GOODFELLOW, M. Evaluation of *Streptomyces* sp. strasin g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.24-32, 2005.

GLICK, R.B.; KARATUROU, C.D.M.; NEWELL, P.C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.533-536. 1995.

GOODFELLOW, M.; WILLIAM, S.T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in biotechnology**. London, 1988, 501p.

GOMES et al. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. **Applied Microbiology**, p.146-150, n.30. 2000.

GRIMES, H. D.; MOUNT, M.S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.6, p.27-30. 1984.

HOFFLAND, E.; BIK, L. *Pseudomonas* - induced resistance against *Fusarium* wilt In: International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, International Society of Plant Pathology, p.216 (abstr), 1993.

JUNQUEIRA, N.T. V; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W., (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, CNPDA/EMBRAPA, p.307- 331, 1991.

KIMPINSKI, J., STURZ, A. V. Managing crop root zone ecosystems for prevention of harmful and encouragement of beneficial nematodes. **Soil Tillage Resource**. v.72, p.213- 221, 2003.

KROSS, R.K.; CAVALCANTI MARTA, M.E.R.M.; BRAGA, E.M. Influência da epiderme do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA), 4. Campinas, **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2001.

LEEMAN, M.; VAN PELT, J. A.; HENDRICKX, M. J.; SCHEFFER, R. J.; BAKKER, P. A H. M.; SCHIPPERS, B. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trial by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374, **Phytopathology**, v.85, p.1301-1305, 1995.

LIMA, J.L. **Seleção de actinobactérias para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151 p. 2005.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-49. 1996.



MAKISHIMA, N. O popular tomate. In: PROGRAMA BRASILEIRO PARA MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA. **Normas de classificação do tomate**. São Paulo: Centro de Qualidade em Horticultura/CEAGESP, 2003. (CQH. Documentos, 26).

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

MELO, I. S. Rizobactérias Promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.87-110, 1998.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, v.1, p.17-67, 1998b.

MOORE-LANDECKER, J. Fundamentals of the Fungi. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey. Prentice-Hall. 1996.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 2002. 626p.

MOURA, A. B. **Actinobactérias como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro**. 1996, 64f., Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de micro-organismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**, Jaguariúna, EMBRAPA – CNPMA, 1998. p.327-343.

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematoide cavernícola da bananeira *Radopholus similis***. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* L.) Walp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.215-222.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

RAMETTI, A.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Prevalence of *fluorescent Pseudomonas* producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. **FEMS Microbiology Ecology**, v.44, p.35-43, 2003.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v.88, p.1158-1164, 1988.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *Atrosptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.

ROMEIRO, R. da S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 1999. 45 p. (Cadernos didáticos, 56).

ROMEIRO, R.S. & BATISTA, U. G. (2002) Preliminary results on PGPR research at the Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/Cordoba.html>. Acesso em dezembro de 2010.

RODRÍGUEZ, R.R.; RODRÍGUEZ, J.M.T.; SAN JUAN, J.A.M. **Cultivo moderno del tomate**. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 1984. 206p.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; FRANÇA, F.H. et al. Cultivo do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) para industrialização. Brasília: Embrapa/CNPH, 1994. 36p. (Embrapa/CNPH. Instruções técnicas, 12).

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; DUTRA, M.R. CAMPOS, V.P. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do Acibenzolar-S-Metil. **Nematologia Brasileira**, v. 28. p.199-206, 2004.

SILVA, A.C.M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. 2007, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2007.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C.; LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.205-211, 1995.

SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.; BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE. p.71-100, 2001.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. 2006. 217p. Tese de (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2006.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O.; ALMEIDA, N.S. Soil *Streptomyces* with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 456-461, 2006.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, n.4, p.447-453, 2010.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; ALMEIDA, G. M. Actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1759-1766, 2006.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473p.

TRONSMO, A. & HJELJORD, L.G. Biological control with *Trichoderma* species. In: Boland, G.j. 7 kuykendall, L.D. (Eds). **Plant-microbe interactions and biological control**. New York. Marcel Dekker, 1998. p.111-126.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v.36.p.453-483, 1998.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biology control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp.strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1991.

VIGLIERCHIO, D.R.1991. **Environmental Biology**. In: VIGLIERCHIO, D.R. (Ed). The World of Nematodes. Davis, California, p.144-168.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.379-407,1998.

WHITEHEAD, A. G. Sedentary endoparasites of roots and tubers (*Meloidogyne* e *Nacobbus*). In: CAB INTERNATIONAL. **Plant nematode control**. Wallingford: CAB, p.209-260. 1997.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. ***Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p.

ZDOR, R.; ANDERSON, A. J Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of beans. **Bulletin-SROP**, v.14, n.8, p.187-190, 1992.

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, p.2198-2208, 2002.

# CAPÍTULO 1

## ACTINOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO<sup>1</sup>

---

1. Artigo ajustado e submetido para a submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Pesquisa Agropecuária Brasileira.

## ACTINOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE TOMATEIRO

**RESUMO:** As actinobactérias são conhecidas pela produção de metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas extracelulares, que atuam na degradação de moléculas complexas, desempenhando papel importante nos processos de compostagem e de promoção de crescimento de plantas. Este trabalho teve como objetivos: caracterizar os isolados de actinobactérias quanto à produção de enzimas extracelulares (xilanase e celulase), solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indolacético, avaliar a densidade populacional dos isolados no substrato antes do plantio e após a coleta das plantas e avaliar o seu potencial na promoção de crescimento de plantas de tomateiro. Do total de 42 isolados de actinobactérias testados, 15 apresentaram atividade xilanolítica, 39 apresentaram atividade celulolítica, nenhum isolado promoveu a solubilização de fosfato de cálcio e 33 apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. No primeiro experimento, em que foram testados 17 isolados de actinobactérias por meio de infestação e incubação do substrato Vivatto Slim®, observou-se um aumento no diâmetro do caule e na massa seca das raízes do tomateiro. Houve aumento nos teores de N e K na parte aérea das plantas cultivadas no substrato infestado com alguns isolados de actinobactérias, porém, não houve diferença significativa para os teores de P. Entretanto, não ocorreram efeitos significativos na promoção de crescimento das mudas de tomateiro no segundo e terceiro experimentos, com diferentes isolados de actinobactérias. Os isolados de actinobactérias multiplicaram e colonizaram o substrato nos três experimentos. Estes isolados de actinobactérias não apresentaram potencial de promoção de crescimento de mudas de tomateiro em substrato orgânico Vivatto Slim®.

**Palavras-chave:** Ácido indolacético, enzimas extracelulares, *Solanum lycopersicum* L., *Sreptomycetes* spp.

## ACTINOMYCETES ON GROWTH OF TOMATO PLANTS

**ABSTRACT:** Actinobacteria are known for production of secondary metabolites, such as antibiotics and extracellular enzymes that act in the degradation of complex molecules, playing an important role in composting processes and plant growth promotion. This study aimed to: characterize isolates of actinomycetes for production of extracellular enzymes (xylanase and cellulase), solubilization of calcium phosphate and production of indol acetic acid, to evaluate the population density of these isolates in plant growth potting mix, and to evaluate their potential for growth promotion of tomato plants. From a total of 42 isolates of actinobacteria tested, 15 and 39 isolates presented xylanolytic and cellulolytic activity, respectively. None of the isolates promoted solubilization of calcium phosphate and 33 presented the ability to produce indol acetic acid. In the first experiment, the potting mix Vivatto Slim® was incubated and infested with 17 actinobacteria, and an increase in stem diameter and root dry matter was observed for tomato plants. There was an increase in N and K levels of aerial parts for plants grown in potting mix infested with some isolates of actinobacteria. However, no significant difference was observed for plant P levels. In the second and third experiments, growth promotion did not occur, with different actinobacteria isolates. The isolates of actinobacteria grew and colonized Vivatto Slim® potting mix, in all experiments. These actinobacteria did not showed a potential for growth promotion of tomato plants in potting mix.

**Key-words:** Indol acetic acid, extracellular enzymes, *Solanum lycopersicum* L., *Sreptomycetes* spp.



## INTRODUÇÃO

O consumo de hortaliças tem aumentado devido à maior conscientização da população, em busca de uma dieta alimentar mais rica e saudável. Desse modo, o desenvolvimento de sistemas de cultivo de hortaliças, visando à otimização da produção tem exigido dos agricultores esforços no sentido de reduzir, ou até mesmo eliminar deficiências do setor produtivo, como problemas nutricionais e fitossanitários das mudas (MONTEZANO & PEIL 2006).

A produção de mudas constitui-se numa das etapas mais importantes do sistema produtivo (MINAMI, 1995; SILVA JÚNIOR et al., 1995). Dela depende o desempenho final das plantas nos canteiros de produção, tanto do ponto de vista nutricional, quanto do tempo necessário para a colheita e, conseqüentemente, do número de ciclos possíveis por ano (CARMELLO, 1995). A produção de hortaliças de boa qualidade depende, entre outros fatores, da qualidade do substrato utilizado na produção de mudas (CARNEIRO, 1995).

O substrato é um insumo básico, utilizado em substituição ao solo, que serve de base física para o crescimento das raízes, dando suporte à planta e disponibilizando-lhe água e nutrientes. Suas características físicas, químicas e biológicas devem oferecer as melhores condições para que haja uma excelente germinação e favoreça o desenvolvimento das mudas (GONÇALVES, 1994).

As principais vantagens para produção em substrato são: as possibilidades de cultivo em áreas com condições físicas, químicas e biológicas inadequadas, melhor monitoramento da irrigação, possibilidade de efetuar desinfecção do substrato para sua reutilização, possibilidade de cultivo onde o solo apresenta desuniformidade. Dentre as desvantagens pode-se citar a baixa capacidade tampão, significando baixa tolerância a erros no manejo da irrigação e fertirrigação, exigindo, portanto, monitoramento constante, custos elevados, alto nível tecnológico para interpretar os resultados e tomar decisões corretas (MILNER, 2002).

O melhor aproveitamento de substratos orgânicos para a produção de mudas pode ainda ser obtido com a inoculação das plantas e/ou do próprio substrato com micro-organismos benéficos como as Bactérias Promotoras de Crescimento (BPCPs) (SOUSA et al., 2006). Estas possuem um importante papel como promotoras de

crescimento vegetal, pela ação direta através da solubilização de nutrientes do substrato, produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas (CATTELAN, 1999) e pela ação indireta, através do controle de fitopatógenos por competição, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (STURZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

As actinobactérias, principalmente as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, compõem um importante grupo de bactérias do solo, conhecidos pela ampla capacidade de produção de metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas extracelulares (INBAR et al., 2005). Durante o processo de compostagem, as actinobactérias, atuam na degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilana e lignina, presentes em abundância na biomassa vegetal (PETROSYAN et al., 2003; DING et al., 2004).

Além da atuação na decomposição da matéria orgânica, estes micro-organismos apresentam grande potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HOSTER et al., 2005) e/ou de promoção de crescimento de plantas (NASSAR et al., 2003, CATTELAN & HARTEL, 2000), devido à capacidade de produção de antibióticos, sideróforos, enzimas com ação antimicrobiana, substâncias promotoras de crescimento de plantas e competição com fitopatógenos por substrato (CATTELAN & HARTEL, 2000), sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentável (COMPANT et al., 2005).

Estudos de promoção de crescimento com 63 isolados de rizobactérias em mudas de cacauzeiro cultivadas em solo não esterilizado, demonstraram incrementos na massa seca da parte aérea e massa seca das raízes de 29,1% e 91,8%, respectivamente (SILVA, 2007). Isolados de actinobactérias promoveram o crescimento e melhoria do estado nutricional de plantas de tomateiro cultivadas em solo estéril (SOARES et al., 2010).

Trabalhos realizados por Sousa et al., (2006), demonstraram o potencial destes de isolados de actinobactérias como agentes de biocontrole de *M. incognita* e promoção de crescimento de plantas de mudas de tomateiro. Segundo estes autores, a promoção de crescimento de mudas de tomateiro pode ser atribuída à capacidade de solubilização de fosfatos, a enzimas que atuam na mineralização dos compostos

orgânicos do substrato e/ou a substâncias reguladoras de crescimento produzido pelos estreptomicetos.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados de actinobactérias quanto à produção de enzimas extracelulares e ácido indolacético, quantificar a densidade populacional após o período de incubação e após a coleta das plantas e avaliar o potencial desses micro-organismos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro cultivar 'Santa Cruz Kada'.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção dos isolados de actinobactérias

Foram inicialmente pré-selecionados 42 isolados de actinobactérias provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB. Sendo que 39 isolados foram oriundos do resíduo seco de sisal (AR 5, AR 18, BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 18, BFT 19, BFT 25, BFT 26, BFT 32, BFT 36, BFT 40, BFT 41, BFT 48, BFT 57, BFT 58, BFT 65, BFT 66, BFT 69, BFT 71, BFT 76, BFT 79, BFT 80, BFT 83, BFT 85, BFT 87, BFT 88, BFT 100, BFT 102, BFT 104, BFT 106, BFT 112, BFT C, BFT D, BFT K, BM 18, BM 22, BM 28 e PD3) (Tabela 1) e 3 isolados (AC 50, AC 92 e AC 147) selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento para o tomateiro (LIMA, 2003; SOUSA et al., 2006, PAIXÃO, 2008).

**Tabela 1.** Códigos dos isolados de actinobactérias, de acordo com a origem do resíduo seco do sisal.

Município	Localidade	Sigla
Serrinha	Araci	AR
Campo Formoso	Belas/Morrinhos	BM
Campo Formoso	Baixa do Feijão/Tiquara	BFT
Campo Formoso	Pau D'arco	PD

## **Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias**

### **Produção de Xilanase e Celulase**

As atividades enzimáticas foram determinadas conforme metodologia descrita por Lewis (1988). Os isolados foram multiplicados em meio mínimo de sais (TUIE, 1969), suplementado com xilana (Sigma) ou celulose microcristalina (Vetec) como única fonte de carbono e as placas incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 28°C durante 15 dias. Após este período, foram adicionados 10mL da solução vermelho congo 0,5% em cada placa, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, removeu-se o excesso da solução de vermelho congo e adicionou-se 10mL da solução salina (NaCl a 1M) em cada placa, sendo estas mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a remoção da solução, observou-se a formação ou não de uma zona de hidrólise de coloração alaranjada em torno das colônias, indicando a atividade celulolítica e xilanolítica dos isolados.

### **Produção de Ácido Indolacético**

Para determinar a produção de ácido indolacético pelos isolados de actinobactérias, utilizou-se a metodologia proposta por Bric et al., (1991). Os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja Agar (10%), acrescido de 5mM de L-triptofano. Posteriormente, cobriram-se as colônias com uma membrana de nitrocelulose e as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 dias. Após este período, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski (GORDON & WELBER, 1951). Os isolados que formaram um halo de coloração alaranjada na membrana, no período de 30 minutos, foram considerados produtores de ácido indolacético.

### **Solubilização de Fosfato de cálcio**

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Katznelson & Bose (1959). Os isolados foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja Agar (10%) acrescido de  $\text{CaHPO}_4$  e as placas incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. por 7 dias. Após este período, a solubilização de fosfato foi detectada pela formação de uma zona de solubilização de aspecto opaco em torno das colônias dos isolados de actinomicetos.

### **Produção de inóculo de actinobactérias**

Para a produção de inóculo, os isolados de actinobactérias preservados em glicerol 20% a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  foram multiplicados em meio de cultura sólido AGS (POTER et al., 1960) em placas de Petri e incubadas por 10 a 12 dias a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  em câmara de crescimento tipo B.O.D. Posteriormente, discos da cultura de actinobactérias foram transferidos para arroz esterilizado, conforme descrito por Soares et al., (2007). O arroz colonizado pelos isolados de actinobactérias foi utilizado para infestação do substrato.

### **Infestação e incubação do substrato:**

Os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio de cultura AGS sólido (POTER, 1960) e incubados por um período de 10 a 12 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, 10 discos de 6mm de diâmetro da cultura das actinobactérias foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado (SOARES et al., 2007), sendo este incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 14 dias. Para quantificação do número de unidades formadoras de colônias das actinobactérias no arroz colonizado, foi adotado o método de diluição seriada do inóculo e plaqueamento em meio AGS sólido, conforme descrito abaixo, com incubação a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 3 dias, até a obtenção do crescimento das colônias para contagem destas. O substrato foi infestado com a suspensão de actinobactérias na proporção de 20g de arroz colonizado para 16L de substrato, fazendo-se o ajuste das UFC/g arroz colonizado. Posteriormente, foi feito o cálculo de acordo com a contagem de UFC e a quantidade de arroz colonizado na suspensão, adotando-se como padrão o isolado (PD3) que apresentou a maior quantidade de UFC/g arroz colonizado.

Para infestação, 20g do arroz colonizado foi colocado em sacos de plástico descartável com capacidade para 1 litro, sendo adicionados 100mL de água destilada esterilizada e agitado para permitir o desprendimento das actinobactérias do arroz. Essa suspensão foi adicionada ao substrato, com agitação manual para distribuição e homogeneização do inóculo. Os substratos infestados foram mantidos em sacos de polietileno e incubados por um período de 40 dias a temperatura ambiente, mantendo-se a umidade constante, com adição de água esterilizada. O tratamento

testemunha foi formado por substrato incubado nas mesmas condições de umidade e temperatura, mas sem infestação com actinobactérias.

### **Quantificação das actinobactérias no substrato e no arroz colonizado**

Após a incubação por 40 dias do substrato infestado, realizou-se a quantificação da população de actinobactérias por meio da técnica da diluição seriada. Amostras de 10g do substrato foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 90mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada e agitadas por 20 minutos em agitador orbital. Em seguida, foram realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina esterilizada, obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Foi realizado o plaqueamento de 100 $\mu$ l das diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  em meio AGS sólido (*Arginine-Mineral Salt Agar*), com três repetições para cada diluição, sendo o inóculo espalhado com auxílio da alça de Drigalski esterilizada por flambagem. O meio de cultura recebeu ciclohexamida na concentração de 100 $\mu$ g/mL para inibição do crescimento de fungos. Para o crescimento dos actinobactérias, as placas foram incubadas por 5 a 7 dias a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  em câmara de crescimento tipo B.O.D. As populações de actinobactérias no substrato foram estimadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e o cálculo com base na seguinte fórmula:  $\text{UFC.g}^{-1} \text{ substrato seco} = N \times 10 \times F \times Y$ , sendo: N = média do número de colônias das três repetições, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 $\mu$ L de suspensão por placa para 1 mL de suspensão), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$ , em que x corresponde ao número de UFC. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A quantificação da densidade populacional de actinobactérias no substrato foi realizada aos 40 dias após a incubação e repetida após a coleta do experimento (das plantas de tomateiro).

Para a quantificação das actinobactérias no arroz colonizado, utilizou-se a mesma metodologia. Porém, não foi utilizado a ciclohexamida e a quantificação da densidade populacional foi realizada aos tres dias após a incubação.

### **Promoção de crescimento de mudas de tomateiro**

Foram realizados ensaios preliminares para a promoção de crescimento, com os 42 isolados de actinobactérias acima indicados. Os pré-ensaios foram realizados, por que até o momento não haviam sido realizados trabalhos com 39 isolados de actinobactérias provenientes do resíduo seco do sisal, constituindo assim no primeiro trabalho. Na pré-seleção foram instalados experimentos com um número maior de actinobactérias e menor quantidade de repetições (dados não apresentados). Os isolados de actinobactérias (AR 18, BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 19, BFT 25, BFT 26, BFT 41, BFT 57, BFT 58, BFT 66, BFT 71, BFT 76, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 104, BFT 106, BFT K, BM 28 e PD 3) promoveram melhores resultados no crescimento de plantas de tomateiro e foram selecionados para condução dos experimentos seguintes.

### **Substrato Vivatto Slim® incubado e infestado com isolados de actinobactérias**

Para avaliar o efeito da infestação e incubação do substrato Vivatto Slim® com isolados de actinobactérias no crescimento de mudas de tomateiro, foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação. No primeiro experimento foram avaliados dezessete isolados oriundos da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, codificados como: BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 19, BFT 25, BFT 26, BFT 41, BFT 58, BFT 66, BFT 71, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 104, BFT 106, BFT K e PD 3. Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos inteiramente ao acaso com dezoito tratamentos, sendo dezessete isolados de actinobactérias e uma testemunha não infestada, com sete repetições. A testemunha foi composta por substrato incubado com água, sem infestação com actinobactérias.

No segundo experimento foram avaliados oito isolados de actinobactérias codificados como AR 18, BFT 4, BFT 26, BFT 57, BFT 71, BFT 76, BM 28 e PD 3. O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos inteiramente ao acaso, com nove tratamentos (oito isolados de actinobactérias e uma testemunha) e sete repetições. A testemunha foi composta por substrato incubado com água, sem infestação com actinobactérias.

Para o terceiro experimento foram avaliados seis isolados de actinobactérias codificados como AR 18, BFT 41, BFT 57, BFT 66, BFT 76 e PD 3. O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos inteiramente ao acaso, com sete

tratamentos (seis isolados de actinobactérias e uma testemunha) e sete repetições. A testemunha foi composta por substrato incubado com água, sem infestação com actinobactérias. O substrato foi esterilizado em autoclave, a 120°C, durante uma hora e meia.

Para instalação do segundo e terceiro experimentos, foram selecionados alguns isolados utilizados no primeiro experimento, com objetivo de verificar diferença no desenvolvimento vegetativo das plantas de tomateiro, visto que os experimentos foram conduzidos em épocas diferentes (o primeiro experimento, durante o inverno e, os demais no verão).

Após os 40 dias de incubação, os substratos foram colocados em sacos de muda pretos de polietileno (15 x 0,9 cm), colocando-se 1 litro de substrato por saco de muda. Para os três experimentos fez-se a semeadura, colocando-se três sementes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada' em cada saco de muda, sendo realizado o desbaste, uma semana após a germinação, deixando-se uma planta por saco. As mudas foram coletadas aos 45 dias após a semeadura, avaliando-se a altura das plantas com auxílio de uma régua milimetrada e o diâmetro do caule à altura dos cotilédones com auxílio de paquímetro digital. Separou-se a parte aérea das raízes das plantas, sendo estas lavadas em água corrente e em seguida, colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Após a secagem em estufa, determinou-se a massa seca da parte aérea e das raízes. Em seguida, foi realizada a moagem e digestão da parte aérea das plantas para quantificar os teores de N, P e K com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (THOMAS et al., 1967). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl, o de fósforo por colorimetria e o de K por fotometria de chama (EMBRAPA 1999) Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### **Avaliação das características químicas no substrato**

As análises químicas das amostras dos substratos, após 40 dias de incubação com actinobactérias e do substrato sem infestação foram realizadas no Laboratório de Solos da empresa CAMPO - ANÁLISES AGRÍCOLAS E AMBIENTAIS. O P, K, Cu, Fe e Zn disponíveis foram extraídos por Mehlich 1 (EMBRAPA, 1997). A extração de



S foi realizada em solução de fosfato monobásico de cálcio. A extração do Ca e Mg disponíveis foram realizadas em cloreto de potássio 1mol/L. O boro foi extraído com água quente. Todos os teores de nutrientes disponíveis foram determinados por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido de argônio. Os teores de nutrientes totais do substrato Vivatto Slim® utilizado neste trabalho são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização química do substrato Vivatto Slim® utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valor
pH (CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> )		5,1
Umidade a 65°C	%	39,0
Relação C/N		61,1
Carbono Orgânico	%	27,9
Matéria Orgânica	%	48,1
N –total	g/kg	2,8
P-total	mg/dm <sup>3</sup>	1677,0
K	cmolc/dm <sup>3</sup>	6,2
Ca	cmolc/dm <sup>3</sup>	23,7
Mg	cmolc/dm <sup>3</sup>	140,7
S	mg/dm <sup>3</sup>	2300,0
B	mg/dm <sup>3</sup>	28,0
Zn	mg/dm <sup>3</sup>	40,0
Fe	mg/dm <sup>3</sup>	6953,0
Mn	mg/dm <sup>3</sup>	215,8
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	8,0
Ni	mg/dm <sup>3</sup>	140,0

Extratores: P, K, Ni e micronutrientes: Mehlich I; S: Fosfato monobásico de cálcio; B: água quente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização fisiológica dos actinobactérias

Do total de 42 isolados de actinobactérias testados, 15 apresentaram atividade xilanolítica, 39 apresentaram atividade celulolítica, 33 apresentaram a capacidade de produção de ácido indolacético. Nenhum dos isolados apresentou capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção de enzimas extracelulares, solubilização de fosfato de cálcio e ácido indolacético (AIA) pelos isolados de actinobactérias.

Isolado de actinobacteria	Enzimas Extracelulares (*)		Solubilização de fosfato	Ácido Indolacético
	Xilanase	Celulase		
AC 50	-	+	-	+
AC 92	+	+	-	+
AC 147	+	+	-	+
AR 5	+	+	-	+
AR 18	+	+	-	+
BFT C	+	+	-	+
BFT D	+	+	-	+
BFT K	-	+	-	-
BFT 4	-	+	-	+
BFT 7	-	-	-	+
BFT11	-	-	-	+
BFT 18	-	+	-	+
BFT 19	-	+	-	+
BFT 25	-	+	-	+
BFT 26	-	+	-	+
BFT 32	+	-	-	+
BFT 36	-	+	-	+
BFT 40	+	+	-	+
BFT 41	-	+	-	-
BFT 48	-	+	-	+
BFT 57	-	+	-	-
BFT 58	-	+	-	-
BFT 65	-	+	-	+
BFT 66	-	+	-	+
BFT 69	-	+	-	-
BFT 71	-	+	-	+
BFT 76	-	+	-	+
BFT 79	-	+	-	+
BFT 80	+	+	-	+
BFT 83	-	+	-	-
BFT85	+	+	-	+
BFT 87	-	+	-	+
BFT 88	-	+	-	+
BFT 100	-	+	-	+
BFT 102	+	+	-	-
BFT 104	+	+	-	-
BFT 106	+	+	-	-
BFT 112	+	+	-	+
BM 18	-	+	-	+
BM 22	-	+	-	+
BM 28	-	+	-	+
PD3	+	+	-	+

Os sinais indicam resposta positiva (+) ou negativa (-) em relação à produção de enzimas, ácido indolacético e solubilização de fosfato de cálcio.

Murashima et al., (2002) descrevem a celulose como um dos componentes mais abundantes da biomassa vegetal, composto de moléculas de glicose unidas por meio de ligações glicosídicas  $\beta$  -1,4 formando cadeias lineares, longas e rígidas e que pode ser degradada por uma série de micro-organismos mediante a ação de celulases. Os micro-organismos com capacidade de degradação deste composto podem ter um importante papel na decomposição da matéria orgânica do solo ou substratos de crescimento de plantas, disponibilizando nutrientes e beneficiando o desenvolvimento das plantas. Estes podem também agir como agentes de biocontrole de fitopatógenos que possuem celulose na sua parede celular (BERG et al., 2000). A xilana é o segundo maior polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e sua estrutura básica consiste de uma cadeia principal línea de xilopiranosil unidos por ligações  $\beta$  -1,4 glicosídicas (HALTRICH, 1996). A produção de xilanase pelos isolados de actinobactérias, indica que estes micro-organismos atuam no processo de decomposição de compostos orgânicos, disponibilizando nutrientes que favorecem a melhoria do estado nutricional e o crescimento das plantas.

Na avaliação da produção do ácido indolacético, 78,5% dos isolados de actinobactérias demonstraram ser produtores desse hormônio que atua no crescimento vegetal. O ácido indolacético afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERE et al., 1986), deixando as plantas com menor suscetibilidade a escassez de nutrientes e ao déficit hídrico (CATTELAN, 1999).

A atividade xilanolítica, celulolítica, quitinolítica, lipídica e a produção de ácido indolacético *in vitro* foram relatadas por Sousa et al., (2006), com resultados significativos na promoção de crescimento e controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro produzidas em substrato incubado com actinobactérias. Contudo, estes autores não observaram correlação positiva entre o efeito benéfico dos actinobactérias e a produção dessas enzimas.

A quantificação dos isolados de actinobactérias no substrato Vivatto Slim®, nos três experimentos, aos 40 dias após infestação e incubação e após a coleta das mudas, revelou densidades populacionais superiores ao tratamento testemunha (não infestado) para todos os isolados de actinobactérias (Tabela 4). No primeiro experimento o substrato não infestado apresentou uma população de actinobactérias de  $0,26 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de substrato antes do plantio e de  $0,36 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de

substrato após o plantio. A população das actinobactérias no substrato infestado variou entre  $6,96 \times 10^6$  e  $0,71 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após os 40 dias de incubação e de  $1,06 \times 10^7$  e  $1,91 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após a coleta das plantas. Para o segundo experimento, os resultados foram semelhantes aos encontrados no primeiro. As densidades populacionais de actinobactérias variaram entre  $2,18 \times 10^6$  a  $2,1 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após os 40 dias de incubação e de  $2,43 \times 10^6$  a  $1,93 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após a coleta das plantas. No terceiro experimento as densidades populacionais variaram de  $2,43 \times 10^6$  a  $3,4 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após a incubação e de  $2,45 \times 10^6$  a  $2,0 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de substrato, após a coleta das plantas (Tabela 4).

Os isolados BFT 4, BFT 26 e PD3 apresentaram baixa multiplicação quando incubados por 40 dias, entretanto, houve boa multiplicação após a coleta das plantas no primeiro experimento. O isolado BFT 4 diferente do primeiro experimento, apresentou redução na densidade populacional após a coleta das plantas no segundo experimento. Os isolados AR 18 e PD3 mantiveram o mesmo comportamento em ambos os experimentos, ou seja, houve aumento na densidade populacional com o isolado AR 18 após a coleta das plantas e o isolado PD3 manteve-se estável, no segundo e terceiro experimentos (Tabela 4).

Em todos os experimentos a população de actinobactérias aumentou nos substratos mantendo-se superior ao tratamento não infestado, após o período de incubação por 40 dias e após a coleta das mudas de tomateiro. O isolado PD3 foi o único presente nos três experimentos. No primeiro experimento, houve aumento da densidade populacional após a coleta das plantas, enquanto que no segundo e terceiro experimentos, a densidade populacional deste isolado manteve-se estável entre o período após a incubação do substrato por 40 dias e após a coleta das plantas (Tabela 4). Provavelmente estas variações na densidade populacional dos isolados ocorreram devido a fatores como umidade e temperatura que não foram controlados, uma vez que outros fatores como substrato, espécie vegetal e isolado foram os mesmos entre os experimentos.

**Tabela 4.** Densidade populacional de actinobactérias no substrato Vivatto Slim® aos 40 dias após incubação e após a coleta das mudas de tomateiro nos três experimentos.

<b>1° Experimento</b>		
Isolado de actinobactéria	Antes do plantio	Após coleta
Testemunha	0,26 x 10 <sup>5</sup> Bg	0,36 x 10 <sup>5</sup> Ag
BFT 4	0,71 x 10 <sup>5</sup> Bf	2,39 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 7	3,00 x 10 <sup>6</sup> Ac	4,01 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 11	1,82 x 10 <sup>6</sup> Ad	2,10 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 19	1,23 x 10 <sup>6</sup> Be	1,01 x 10 <sup>7</sup> Aa
BFT 25	1,50 x 10 <sup>6</sup> Bd	2,56 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 26	1,19 x 10 <sup>6</sup> Be	7,30 x 10 <sup>6</sup> Ab
BFT 41	4,29 x 10 <sup>6</sup> Ab	3,92 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 58	1,12 x 10 <sup>6</sup> Be	2,89 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 66	1,69 x 10 <sup>6</sup> Bd	6,85 x 10 <sup>6</sup> Ab
BFT 71	4,46 x 10 <sup>6</sup> Ab	2,78 x 10 <sup>6</sup> Bd
BFT 87	2,43 x 10 <sup>6</sup> Ac	3,02 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 88	6,96 x 10 <sup>6</sup> Aa	3,90 x 10 <sup>6</sup> Bc
BFT 102	1,54 x 10 <sup>6</sup> Bd	1,06 x 10 <sup>7</sup> Aa
BFT 104	0,79 x 10 <sup>5</sup> Bf	4,09 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 106	3,76 x 10 <sup>6</sup> Ab	1,91 x 10 <sup>6</sup> Bd
BFT K	2,26 x 10 <sup>6</sup> Bc	2,92 x 10 <sup>6</sup> Ad
PD3	1,06 x 10 <sup>6</sup> Be	2,49 x 10 <sup>6</sup> Ad
CV (%)	13,7	

<b>2° Experimento</b>		
Isolado de actinobactéria	Antes do plantio	Após a coleta
Testemunha	2,10 x 10 <sup>5</sup> Ad	1,93 x 10 <sup>5</sup> Ad
AR 18	1,08 x 10 <sup>6</sup> Bb	2,43 x 10 <sup>6</sup> Aa
BFT 4	2,18 x 10 <sup>6</sup> Aa	1,36 x 10 <sup>6</sup> Bb
BFT 26	1,19 x 10 <sup>6</sup> Ab	9,00 x 10 <sup>5</sup> Ac
BFT 57	1,04 x 10 <sup>6</sup> Ab	9,03 x 10 <sup>5</sup> Ac
BFT 71	6,90 x 10 <sup>5</sup> Ac	6,46 x 10 <sup>5</sup> Ac
BFT 76	1,76 x 10 <sup>6</sup> Aa	8,10 x 10 <sup>5</sup> Bc
BM 28	1,21 x 10 <sup>6</sup> Ab	9,63 x 10 <sup>5</sup> Ac
PD3	2,12 x 10 <sup>6</sup> Aa	2,40 x 10 <sup>6</sup> Aa
CV (%)	16,3	

<b>3° Experimento</b>		
Isolado de actinobactéria	Antes do plantio	Após a coleta
Testemunha	3,40 x 10 <sup>5</sup> Ab	2,00 x 10 <sup>5</sup> Ad
AR 18	1,08 x 10 <sup>6</sup> Ba	2,45 x 10 <sup>6</sup> Aa
BFT 41	1,75 x 10 <sup>6</sup> Ab	1,03 x 10 <sup>6</sup> Bb
BFT 57	2,87 x 10 <sup>6</sup> Aa	1,55 x 10 <sup>6</sup> Ba
BFT 66	1,04 x 10 <sup>6</sup> Ab	9,03 x 10 <sup>5</sup> Ac
BFT 76	2,38 x 10 <sup>6</sup> Aa	8,00 x 10 <sup>5</sup> Ac
PD3	2,43 x 10 <sup>6</sup> Aa	2,07 x 10 <sup>6</sup> Aa
CV (%)	16,2	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do período de incubação (aos 40 dias após incubação e após a coleta do experimento) para o mesmo isolado de actinobactéria. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactéria entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Estes resultados indicam que as actinobactérias colonizaram o substrato, mas o crescimento depende do isolado de actinobactéria e da capacidade deste em utilizar os nutrientes do substrato e crescer nessas condições de cultivo. A colonização do substrato pelos isolados de actinobactérias é importante, pois propicia a competição por nicho e o seu estabelecimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal. A infestação do substrato antes do plantio pode promover a estabilização da comunidade de rizobactérias. O substrato forneceu nutrientes para a multiplicação dos isolados de actinobactérias.

Sousa et al. (2006), verificaram que 43 dias foi o melhor período de incubação do substrato Plantmax® para que houvesse efeito benéfico dos actinomicetos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro. Este período está provavelmente associado ao ciclo de vida dos actinobactérias e a produção de enzimas extracelulares envolvidas na decomposição de compostos orgânicos presentes no substrato e na liberação de nutrientes para a planta (SOUSA et al., 2006; JAMES et al., 1991).

### **Crescimento de mudas de tomateiro no substrato Vivatto Slim® infestado e incubado com isolados de actinobactérias**

No primeiro experimento, foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os isolados quanto ao diâmetro caulinar e massa seca das raízes (Tabela 5). Entretanto, não houve diferença significativa para a altura das plantas e produção de massa seca da parte aérea. Foram obtidos incrementos no diâmetro caulinar das mudas produzidas no substrato infestado com seis isolados de actinobactérias (BFT 7, BFT 26, BFT 58, BFT 102, BFT 104 e BFT 106). O isolado BFT 104 destacou-se promovendo incremento de 19,6% no diâmetro caulinar em relação às mudas produzidas no substrato não infestado.

Com relação à massa seca das raízes, os isolados BFT 7, BFT 41, BFT 87, BFT 88, BFT 104 e BFT 106 promoveram os melhores resultados ( $P \leq 0,05$ ), proporcionando incremento de 76,0%, comparado com o tratamento não infestado (Tabela 5).

**Tabela 5.** Altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) das mudas de tomateiro cultivadas em substrato Vivatto Slim® infestado e incubado com os isolados de actinobactérias.

Isolado de actinobactéria	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	MSPA (g)	MSR (g)
Testemunha	96,14 a*	5,85 b	9,02 a	0,83 c
BFT 4	92,14 a	6,00 b	9,31 a	1,22 b
BFT 7	95,28 a	6,85 a	9,44 a	1,45 a
BFT 11	93,57 a	5,57 b	10,10 a	1,22 b
BFT 19	90,00 a	6,14 b	10,10 a	1,22 b
BFT 25	86,85 a	6,14 b	9,55 a	1,14 b
BFT 26	91,00 a	6,85 a	10,39 a	1,26 b
BFT 41	89,71 a	6,00 b	9,68 a	1,45 a
BFT 58	91,42 a	6,57 a	9,77 a	1,15 b
BFT 66	92,28 a	5,85 b	9,72 a	1,22 b
BFT 71	89,28 a	5,85 b	9,56 a	1,15 b
BFT 87	88,85 a	6,00 b	9,27 a	1,46 a
BFT 88	93,85 a	5,85 b	9,64 a	1,34 a
BFT 102	90,85 a	6,42 a	10,42 a	1,25 b
BFT 104	88,57 a	7,00 a	9,80 a	1,28 a
BFT 106	86,00 a	6,42 a	9,93 a	1,36 a
BFT K	87,57 a	5,57 b	9,71 a	1,24 b
PD3	90,57 a	5,85 b	9,15 a	1,13 b
CV (%)	7,80	11,94	9,25	17,35

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

No segundo experimento, não foram verificadas diferenças significativas entre os isolados de actinobactérias com relação à altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca da parte aérea e massa seca das raízes que também não diferiram da testemunha sem infestação (Tabela 6A).

No terceiro experimento, não houve efeito significativo da infestação e incubação do substrato por 40 dias antes do plantio com os isolados de actinobactérias sobre a altura das plantas, diâmetro caulinar, produção de massa seca da parte aérea das plantas. Houve diferença significativa na massa seca das raízes, entretanto, alguns isolados apresentaram efeito inferior à testemunha (Tabela 6B).

No primeiro experimento, verificou-se que todos os isolados de actinobactérias promoveram incrementos significativos na produção de massa seca das raízes do tomateiro, enquanto que 6 isolados (BFT 7, BFT 26, BFT 58, BFT 102, BFT 104 e BFT 106) promoveram aumento no diâmetro caulinar das plantas. Possivelmente, o Vivatto Slim® por ser um substrato rico em nutrientes, as actinobactérias, mesmo crescendo e colonizando o substrato, não promoveram um efeito significativo na disponibilização dos nutrientes para serem absorvidos pelas plantas.

**Tabela 6.** Altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) das mudas de tomateiro cultivadas em substrato Vivatto Slim® infestado e incubado com os isolados de actinobactérias.

**A – 2º Experimento**

Isolado	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	MSPA (g)	MSR (g)
Testemunha	57,85 a	5,71 a	6,13 a	1,11 a
AR 18	60,42 a	5,71 a	7,25 a	1,06 a
BFT 4	55,85 a	5,14 a	7,16 a	1,26 a
BFT 26	59,57 a	5,71 a	6,92 a	1,21 a
BFT 57	56,57 a	5,57 a	7,11 a	1,45 a
BFT 71	55,42 a	5,42 a	7,23 a	1,04 a
BFT 76	55,42 a	5,14 a	6,59 a	0,93 a
BM 28	56,71 a	5,71 a	6,84 a	1,08 a
PD3	57,85 a	5,42 a	7,32 a	1,13 a
CV (%)	9,70	14,86	13,90	22,83

**B - 3º Experimento**

Isolado	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	MSPA (g)	MSR (g)
Testemunha	75,42 a	5,57 a	8,33 a	1,37 a
AR 18	73,00 a	6,14 a	8,46 a	1,07 b
BFT 41	75,00 a	5,85 a	8,65 a	0,92 b
BFT57	80,00 a	6,00 a	9,07 a	1,32 a
BFT 66	74,42 a	5,85 a	8,84 a	1,24 a
BFT 76	69,14 a	6,28 a	8,48 a	1,30 a
PD3	75,00 a	6,57 a	8,70 a	0,94 b
CV (%)	12,56	11,73	12,41	23,66

\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

O crescimento radicular pode ter ocorrido devido à produção de ácido indolacético, verificado nos testes *in vitro* com os isolados de actinobactérias (BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 25, BFT26, BFT 66, BFT 71, BFT 87, BFT 88 e PD3) ou ainda devido a produção de enzimas extracelulares, como a celulase, que foi verificada com 15 isolados de actinobactérias utilizados neste experimento (Tabelas 2 e 5).

A produção de ácido indolacético favorece o desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (OLIVEIRA et al., 2003) e, como consequência, proporcionam a melhor exploração do solo ou substrato pela planta (CATTELAN & HARTEL, 2000). A promoção de crescimento do sistema radicular, principalmente do crescimento de raízes secundárias e aumento dos pelos radiculares tem sido observada por diversos autores, em trabalhos com rizobactérias (SILVEIRA, 2001). A síntese de fitohormônios por bactérias associadas a plantas é uma das formas mais importantes de interação planta-bactéria, causando modificações na morfologia das raízes, proporcionando desenvolvimento do sistema



radicular e, melhoria na exploração do solo, tornando as plantas menos susceptíveis ao déficit hídrico e a escassez de nutrientes (SPAEPEN et al., 2007).

O ácido indolacético pertence ao grupo das auxinas, tendo como precursor de sua biossíntese, o triptofano, que se encontra presente nos tecidos vegetais, estimulando a multiplicação celular e promovendo o crescimento vegetal (TIEN et al., 1979). Este fitohormônio produzido pelas bactérias, quando se encontra em concentrações baixas, atua estimulando o crescimento, e o mesmo em concentrações altas, prejudicam o desenvolvimento radicular (SILVEIRA, 2008).

A produção de celulase tem um papel importante na degradação da matéria orgânica de origem vegetal, podendo ser este um dos mecanismos que atuam na promoção de crescimento de plantas por estes micro-organismos. Murashima et al. (2002) descrevem a celulose como um dos componentes mais abundantes da biomassa vegetal, composto de moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4), formando cadeias lineares, longas e rígidas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002) e que pode ser degradada por uma série de micro-organismos mediante a ação da celulase. A ação da celulase  $\beta$  (1-4) glucosidase ocorre com a clivagem da celulose, molécula complexa e recalcitrante, desdobrando-a em um dissacarídeo chamado celobiose e uma glicose. As reações envolvidas na degradação da celulose do solo tornam o carbono disponível para o crescimento de microrganismos (DENG & TABATABAI, 1994).

Patten & Glick (2002) verificaram que *Pseudomonas putida* aumentou de 35% a 50 % o crescimento primário das raízes de canola (*Brassica campestris*), devido à produção de AIA. Eles demonstraram diretamente que o fitorregulador bacteriano tem um papel importante na alongação da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta hospedeira. Efeito semelhante foi obtido por Cattelan (1999) com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. em soja. Barazani & Friedman (1999) estudaram a promoção de crescimento de plantas de alface por substâncias secretadas por rizobactérias e verificaram que o crescimento das plantas foi mediado pela produção de auxinas.

Soares et al. (2010) obtiveram incrementos de até 71% na altura das plantas, 73% no diâmetro do caule, 266% na produção de massa seca na parte aérea e 300% na produção de massa seca nas raízes das mudas de tomateiro, cultivadas no solo infestado e incubado com os isolados de actinobactérias. Lima (2003), estudando o

efeito da infestação do solo com isolados de *Streptomyces* spp., em plantas de tomateiro obteve incrementos de 21,53 % no crescimento da parte aérea e de 94 % na produção de matéria de seca de raízes de tomateiro.

Trabalhos com produção de mudas de tomateiro cultivadas em substrato Plantmax® infestados e incubados com actinobactérias demonstraram incrementos significativos, com valores entre 96,9% e 165,1% para altura das plantas, entre 44,8% e 87,5% para a massa seca da parte aérea e entre 31,6 % e 51,3 % para matéria seca das raízes (SOUSA et al., 2009). Mafia et al. (2005) obtiveram aumento de 52% a 69% na biomassa radicular de mudas clonais de eucalipto, quando tratadas com rizobactérias.

Nos três experimentos foram verificados que alguns isolados de actinobactérias promoveram incrementos significativos na parte aérea das mudas de tomateiro ( $P \leq 0,05$ ) nos teores de potássio (K) e nitrogênio total (N-total) das mudas de tomateiro. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao teor de fósforo (P) (Tabela 7). Em alguns casos o teor de N da parte aérea das plantas cultivadas no substrato infestado com actinobactérias não diferiu significativamente da testemunha.

No primeiro experimento verificou-se um aumento dos teores de N-total de 93,3% na parte aérea das mudas de tomateiro crescidas nos substratos infestados e incubados com o isolado BFT 11, quando comparados com o tratamento testemunha. No segundo experimento, o aumento nos teores de N na parte aérea das mudas de tomateiro variou de 52,3% a 95,3% para as plantas crescidas nos substratos infestados e incubados com os isolados BFT 57 e BM 28, respectivamente, comparados à testemunha. No terceiro experimento, somente houve aumento nos teores de N na parte aérea das mudas de tomateiro crescidas no substrato infestado e incubado com o isolado BFT 57, com aumento de 51,93% em relação à testemunha. Os teores de P na parte aérea das mudas variaram de 9,9 a 13,84 g/kg, de 10,75 a 13,75 g/kg e de 11,90 a 13,75 g/kg para o primeiro, segundo e terceiro experimentos, respectivamente (Tabela 7).

Quanto ao teor de K na parte aérea das mudas de tomateiro, os tratamentos com isolados de actinobactérias não diferiram estatisticamente da testemunha sem infestação com actinobactérias no primeiro experimento (Tabela 7).

**Tabela 7.** Teor de NPK da parte aérea das plantas de tomateiro produzidas em substrato Vivatto Slim® infestados e incubados com isolados de actinobactérias.

1° Experimento			
Isolado	N	P	K
	g/kg de massa seca da parte aérea das plantas		
Testemunha	18,75 c	12,13 a	12,05 a
BFT 4	33,50 a	11,51 a	10,75 b
BFT 7	28,25 b	11,19 a	8,50 b
BFT 11	37,00 a	10,25 a	12,00 a
BFT 19	24,75 c	11,00 a	10,25 b
BFT 25	26,25 c	10,26 a	9,75 b
BFT 26	31,75 a	11,60 a	11,50 a
BFT 41	23,50 c	12,12 a	12,05 a
BFT 58	27,75 b	10,53 a	11,25 b
BFT 66	21,50 c	11,80 a	12,25 a
BFT 71	33,50 a	11,16 a	11,75 a
BFT 87	32,75 a	13,17 a	11,75 a
BFT 88	27,75 b	9,90 a	9,75 b
BFT 102	24,25 c	10,03 a	11,00 a
BFT 104	28,50 b	10,19 a	10,00 b
BFT 106	28,28 b	10,50 a	8,50 b
BFT K	31,00 a	12,13 a	13,50 a
PD3	21,00 c	13,84 a	13,25 a
CV (%)	11,25	19,48	15,80

### 2° Experimento

Isolado	N	P	K
	g/kg de massa seca da parte aérea das plantas		
Testemunha	18,05 c	12,25 a	12,25 b
AR 18	23,50 c	13,75 a	12,25 b
BFT 4	33,50 a	11,50 a	10,75 b
BFT 26	31,75 a	11,75 a	11,50 b
BFT 57	27,50 b	12,50 a	13,75 a
BFT 71	33,50 a	11,25 a	11,75 b
BFT 76	21,50 c	10,75 a	12,00 b
BM 28	35,25 a	12,50 a	12,25 b
PD3	21,00 c	13,75 a	13,25 a
CV(%)	10,11	21,37	8,68

### 3° Experimento

Tratamento	N	P	K
	g/kg de massa seca da parte aérea das plantas		
Testemunha	18,10 b	12,30 a	12,00 a
AR 18	23,50 b	13,69 a	12,25 a
BFT 41	23,50 b	12,12 a	12,00 a
BFT 57	27,50 a	12,20 a	13,70 a
BFT 66	21,50 b	11,81 a	12,25 a
BFT 76	21,50 b	10,92 a	12,05 a
PD3	21,00 b	13,84 a	13,15 a
CV (%)	11,85	22,78	9,24

Letras iguais, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

No segundo experimento foram verificados aumento de 8,16% e 12,24% nos teores de K na parte aérea das mudas crescidas nos substratos infestados e incubados com os isolados PD3 e BFT 57. Não houve efeito significativo da infestação com os isolados de actinobactérias sobre os teores de potássio na parte aérea das plantas no terceiro experimento (Tabela 7).

Mudas de tomateiro cultivadas em solo infestado e incubado com isolados de actinobactérias obtiveram incrementos de 400% e 281% no acúmulo de P e K, respectivamente, quando comparadas com as mudas do tratamento controle (SOARES et al., 2010). Sousa et al. (2009) verificaram que mudas de tomateiro cultivadas no substrato Plantmax® incubado com isolados de actinobactérias obtiveram aumentos de 220%, 200% e 242% no acúmulo de N, P e K, respectivamente, comparados à testemunha.

De acordo com Jones Junior (1999), mudas de tomateiro produzidas em cultivo protegido apresentaram teor de N na faixa de concentração adequada de 28 a 60 g/kg. Camargos et al. (1998), cultivando o híbrido Carmen, obtiveram concentração de N entre 36,2 a 39,9 g/kg nas folhas. No presente trabalho, verificou-se que o teor de N na parte aérea das plantas crescidas nos substratos infestados com os isolados BFT 11, BM 28, BFT 4 e BFT 71 ficou próximo aos valores encontrados por estes autores (Tabela 7).

O teor de P ficou acima da faixa de 3,0 a 9,0 g/kg, considerada ideal por Jones Júnior (1999) para a cultura do tomateiro. Quanto ao K, em todos os experimentos verificaram-se teores inferiores aos considerados adequados para a maioria das culturas. De acordo com Marschner (1995), concentrações de K entre 20,0 e 50,0 g/kg de massa seca são consideradas adequadas para o crescimento da maioria das plantas. Segundo a Embrapa Hortaliças (2010), os níveis adequados de nutrientes obtidos em análise foliar de tomateiro são 40 a 60 g/kg, 2,5 a 7,5 g/kg e 30 a 50 g/kg para nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente.

Quanto aos nutrientes disponíveis no substrato, os teores de macro e micronutrientes obtidos na maioria dos tratamentos foram próximos aos encontrados na testemunha. Entretanto, por não haver repetições das amostras, não procedeu a análise estatística (Tabela 8).

**Tabela 8.** Teores de nutrientes disponíveis do substrato Vivatto Slim® infestado e incubado com actinobactérias, após 40 dias de incubação.

Tratamento	P	S	K	Ca	Mg	B	Zn	Fe	Mn	Cu
	mg/dm <sup>3</sup>		cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>			mg/dm <sup>3</sup>				
Testemunha	364,4	647,0	1,0	6,7	7,1	4,8	3,6	137,0	35,4	0,6
AR18	511,7	548,0	1,1	9,6	8,8	5,9	5,7	135,0	75,5	0,4
BFT 4	480,2	633,0	1,8	8,0	8,4	6,0	5,0	142,0	61,8	0,3
BFT 7	529,3	589,0	2,2	10,5	11,1	6,7	8,2	182,0	77,9	0,5
BFT 11	480,6	689,0	1,8	10,3	9,4	6,2	5,5	130,0	67,2	0,4
BFT 19	415,4	564,0	1,6	7,0	8,2	6,0	5,3	162,0	52,0	0,5
BFT 25	477,2	667,0	2,0	8,9	8,4	5,7	5,0	117,0	67,2	0,4
BFT 26	560,5	618,0	2,2	9,8	10,3	5,6	9,0	173,0	77,0	0,4
BFT 41	491,1	609,0	2,0	8,8	8,1	5,9	5,1	152,0	72,2	0,4
BFT 57	493,0	731,0	1,0	7,1	9,5	5,7	6,4	164,0	66,3	0,5
BFT 58	538,4	613,0	2,1	11,2	10,1	6,7	6,4	139,0	80,6	0,3
BFT 66	492,0	684,0	2,0	10,0	9,7	6,8	6,4	179,0	73,8	0,3
BFT 71	530,1	774,0	2,2	10,0	10,6	6,0	5,4	139,0	55,3	0,3
BFT 76	551,8	968,0	1,3	13,2	11,7	5,7	8,3	107,0	83,5	0,5
BFT 87	507,1	577,0	2,0	9,6	10,4	5,5	5,3	177,0	67,4	0,4
BFT 88	535,3	703,0	2,1	7,3	7,6	7,2	6,6	169,0	70,7	0,4
BFT 102	367,7	589,0	1,5	8,4	9,5	6,4	4,0	165,0	48,0	0,4
BFT 104	463,3	729,0	1,9	8,3	8,7	6,1	6,4	153,0	66,1	0,4
BFT 106	361,5	657,0	1,3	8,2	9,1	6,3	5,0	170,0	52,7	0,4
BFT K	407,1	736,0	1,6	8,4	9,0	7,1	4,1	169,0	55,3	0,4
BM 28	496,1	842,0	2,2	9,9	10,7	6,4	6,2	163,0	60,6	0,3
PD3	528,6	731,0	2,2	9,4	9,0	6,5	7,8	133,0	82,5	0,5

O substrato orgânico Vivatto Slim® é rico em nutrientes disponíveis (Tabela 8), sendo constituído de casca de Pinus bioestabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica. Assim, quantidade de nutrientes disponíveis no substrato, independente da contribuição dos isolados de actinobactérias através da decomposição da matéria orgânica já atendeu a demanda da cultura do tomateiro, que apresenta ciclo curto (coleta foi realizada aos 45 dias após a germinação das sementes). Por esta razão, possivelmente não foi observado efeito significativo dos tratamentos com actinobactérias.

Freitas et al., (2003) sugeriram que aspectos nutricionais do substrato (areia e/ou esterco), em que se desenvolviam plantas de alface deveriam influenciar a capacidade de promoção do crescimento por bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Freitas & Aguilar-Vildoso (2004), testaram dois substratos (Plantmax® e areia) inoculados com *Pseudomonas*, no cultivo de citrus. Os autores observaram que as plantas de citrus cultivadas no substrato Plantmax® apresentaram produção de massa seca da parte aérea e das raízes superiores àquelas cultivadas em areia. Concluíram que *Pseudomonas fluorescentes* tem seu desenvolvimento influenciado

pelo substrato e pelo ambiente em que se desenvolvem, particularmente pela rizosfera.

O fato dos tratamentos não causarem aumentos significativos na altura de plantas e matéria seca da parte aérea ou nos aspectos nutricionais, pode ser atribuído a diversos fatores. Estudos com número superior de isolados são necessários para obtenção de isolados promissores, principalmente porque menos de 1 % das rizobactérias são capazes de promover crescimento em plantas (CHEN et al., 1996).

O estudo de promoção de crescimento demonstrou que nas condições experimentais testadas, os isolados de actinobactérias não foram capazes de estimular o crescimento das mudas de tomateiro e nem tiveram efeito negativo ao seu crescimento.

## CONCLUSÕES

1. As actinobactérias têm a capacidade de produzir enzimas extracelulares e ácido indolacético sob condições *in vitro*;
2. As actinobactérias têm a capacidade de multiplicar e colonizar o substrato orgânico de produção de mudas Vivatto Slim®.
3. A infestação e incubação do substrato Vivatto Slim® por 40 dias com os isolados de actinobactérias não resultou em efeito significativo no crescimento e nutrição das mudas de tomateiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBIERI, P., ZANELLI, T., GALLI, E. & ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.10, p.2397-2406, 1999.

BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E.M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium* wilt. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1-10, 2000.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in so assay for indolacetic acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.2, p.535-538, 1991.

CAMARGOS, M.I. **Produção e qualidade de tomate longa vida em estufa, em função do espaçamento e do número de cachos por planta.**, 68p. 1998. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.

CARMELLO, Q.A.C. Nutrição e adubação de mudas hortícolas. In: MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade.** São Paulo: T.A. Queiroz, 1995. p.27-37.

CARNEIRO, J.G.A. **Produção e controle de qualidade de mudas vegetais.** Curitiba: UFPR/FUPEL, 1995. 451p.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal**, v.63, p.1670-1680, 1999.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. **Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR).** In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p.213-234.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.) **Management of soil born disease.** Ludhiana: Kalyani Publishers, p.165-184, 1996.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promotion bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future perspectives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4951-4959, 2005.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1347-1354, 1994.

DING, C.H.; JIANG, Z.Q.; LI, X.T.; LI, L.T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, n.1, p.7-10, 2004.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

EMBRAPA - **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**/ Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. In: SILVA, F.C. (Org.). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370 p.

EMBRAPA. **Nutrição e Adubação**. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas\\_producao/cultivo\\_tomate\\_industrializacao/adubacao.html](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_tomate_industrializacao/adubacao.html)> Acesso em: 27 de janeiro de 2011.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000a, São Carlos, Programa e resumos... São Carlos: UFSCar, p.255-258. 2000.

FREITAS, S.S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**. 1994. 112p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 1994.

FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.61-70, 2003.



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

GONÇALVES, A.L. **Substratos para produção de mudas ornamentais**. In: MINAMI, K.; TESSARIOLI NETO, J.; PENTEADO, S.R.; SCARPARE FILHO, J.A. Produção de mudas hortícolas de alta qualidade. ESALQU/SEBRAE, 156p, 1994.

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

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v.58, p.137-161, 1996.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, p.434-442, 2005.

INBAR, E.; GREEN, S.J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. **Microbial Ecology**. v.50, p.73-81. 2005.

JAMES, P.D.; EDWARDS, D.; DAWSON, M.J. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *S. thermoviolaceus* grow in chemostat. **Journal General Microbiology**, v.137, p.1715-1720, 1991.

JONES JÚNIOR, J.B. **Tomato plant culture: in the field, greenhouse and home garden**. Florida: CRC Press. 199p. 1999.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.

LIMA, J.L. Seleção de actinobactérias para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro. 2003. 82p.. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

LEWIS, K.J. Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler. Sheffield: University of Sheffield, 1988. 125p. PhD Thesis.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C; FERREIRA,E.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. de. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.843-851, 2005.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 1995. 2. ed. London: Academic Press. 889 p.

MILNER, L. Manejo de irrigação e fertirrigação em substratos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 3., Campinas, 2002. Documentos IAC 70. Campinas, Instituto Agrônomo, 2002. p.45-51.

MINAMI, K. Produção de mudas de alta qualidade em horticultura. São Paulo: T.A. Queiroz, 1995. 135p.

MONTEZANO, E.M.; PEIL, R.M.N. Sistemas de consórcio na produção de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.2, p.129-132, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

MURASHIMA, K.A.; KOSUGI, Y.R.H.; DOI, R.H. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.5088-5095, 2002.

NASSAR, A.H.; EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.97-106, 2003.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de micro-organismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematoide cavernícola da bananeira *Radopholus similis***. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002.

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.269-273, 2003.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**, v.8, p.174-178, 1960.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

SILVA JÚNIOR, A.A.; MACEDO, S.G.; SLUKER, H. **Utilização de esterco de peru na produção de mudas de tomateiro**. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 28p. (Boletim Técnico, 73).

SILVA, A.C.M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. 2007, 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2007.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**, Recife, UFRPE, 2001.

SILVEIRA, A.B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2008, 113p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2008.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O. Production of *Streptomyces* inoculum in sterilized rice. **Scientia Agrícola**, v.64, n.6, p.641-644, 2007.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, n.4, p.447-453, 2010.

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

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico infestado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, v.68, n. 1, p. 195-203, 2009.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, O.; REMANS, R. Indole-3-acetic acidin microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.4, p. 425448, 2007.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.5, p.1016-1024, 1979.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess 1969. 239 p.

THOMAS, R.L.; SHEARRD, R.W.; MOYER, J.R. Comparasion of conventional and automated procedures for N, P and K analysis of plant material using a single digestion. **Agronomy Journal**, v.59: p.240-243, 1967.

## **CAPÍTULO 2**

### **POTENCIALIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS NO BIOCONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM MUDAS DE TOMATEIRO**

## POTENCIALIDADE DE ACTINOBACTÉRIAS NO BIOCONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM MUDAS DE TOMATEIRO

**RESUMO:** A meloidoginose é umas das mais importantes doenças do tomateiro, e de difícil controle. A busca por alternativas de manejo tem intensificado os estudos com actinobactérias em programas de controle biológico e promoção de crescimento de plantas. O presente trabalho teve como objetivos: caracterizar fisiologicamente os isolados de actinobactérias, avaliar o efeito de metabólitos secundários produzidos por isolados na mortalidade de (J2) de *Meloidogyne javanica* e no controle desses nematoides em mudas de tomateiro. Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf, sendo adicionados em cada tubo, 50µL de uma suspensão contendo 25 juvenis de *M. javanica* e 500µL de meio de cultura líquido contendo os metabólitos. A mobilidade e mortalidade dos nematoides foram avaliadas após a incubação por 24, 48 horas e 72 horas. Dos 42 isolados avaliados, 71,4% e 92,8% demonstraram atividades quitinolítica e lípidica. Os metabólitos produzidos pelas actinobactérias, em meio de cultura líquido, causaram mortalidade dos J2 de *M. javanica*, em até 88,8% (BFT 4). Nos experimentos em que o substrato de produção de mudas e o solo foram infestados com actinobactérias, 15 dias após a germinação das sementes, realizou-se a inoculação ou não com 1000 J2 e 2000 ovos por planta. Aos 35 dias após a inoculação, realizou-se a coleta das mudas de tomateiro. Raízes de mudas de tomateiro cultivadas no substrato Vivatto Slim® infestados com o isolado BFT 104 apresentaram redução no número de galhas (NG) por planta, NG/g de raiz, massa de ovos (MO) por planta e MO/g de raiz de 42,7%, 62,2%, 68,4 e 76,4%, respectivamente. Contudo, os isolados não promoveram o crescimento do tomateiro quando inoculados ou não com nematoides. A maior redução no nível de dano das raízes de tomateiro cultivadas no solo, foi verificada com o isolado BFT 4, com 51,0%, 73,7%, 49,4% e 72,8% no NG/planta, NG/g raiz, MO/planta e MO/g de raiz. Alguns isolados promoveram o crescimento das mudas de tomateiro, mesmo na presença dos nematoides. As actinobactérias multiplicaram e colonizaram o substrato e/ou solo e, demonstraram potencial para o controle de *M. javanica*.

**Palavras-chave:** Controle biológico, metabólitos secundários, meloidoginose, *Streptomyces* sp.

## POTENCIALITY OF ACTINOMYCETES FOR CONTROL OF *Meloidogyne javanica* IN TOMATO PLANTS

**ABSTRACT:** Root knot is one of the most important tomato diseases, and is difficult to control. The searches for alternative management practices, has intensified his studies with actinobacteria in biological control and plant growth promotion. This study aimed to characterize physiologically isolates of actinobacteria, to evaluate the effect of secondary metabolites produced by actinobacteria on mortality of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica* and the control of these nematodes in tomato plants. A bioassay was set up in Eppendorf tubes with 50 $\mu$ L of a suspension with 25 juveniles of *M. javanica* and 500 $\mu$ L of medium containing the metabolites produced by actinomycetes. The mobility and mortality of nematodes were evaluated after incubation for 24, 48 and 72 hours. Of the 42 isolates tested, 71.4% and 92.8% presented chitinase and lipase activity, respectively. Metabolites produced by actinobacteria caused mortality of *M. javanica* up to 88.85% (BFT 4). In the experiments where Vivatto Slim® plant growth potting mix and soil were infested, plants were inoculated or not with 1000 J2 and 2000 eggs of *M. javanica*, per plant, 15 days after germination, and were harvested 35 days after inoculation. Roots of tomato plants grown in potting mix Vivatto Slim® infested with isolate BFT104 presented reduction in the number of galls (NG) per plant, NG/g of root, egg mass (MO) per plant and MO/g of root of 42.7%, 62.2%, 68.4% and 76.4% respectively. However, the isolates did not promote the growth of tomato plants when inoculated or not with nematodes. The largest reduction in the level of damage of tomato roots grown in soil, was verified with the isolated BFT 4, with 51.0%, 73.7%, 49.4% and 72.8% in the NG/plant, NG/g of root, MO/plant, and MO/g of root. Some isolates promoted growth of tomato plants, even in the presence of nematodes. The isolates of actinobacteria grew and colonized Vivatto Slim® potting mix and soil. The actinobacteria have potential to control of *M. javanica*.

**Key-words:** Biological control, secondary metabolites, root knot, *Streptomyces* sp.



## INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é uma cultura de grande importância econômica, sendo uma das mais cultivadas e consumidas, devido a inúmeros fatores, dentre eles a versatilidade quanto ao seu uso, o valor nutritivo e comercial (FERNANDES et al., 2007).

Os patógenos de solo possuem grande importância na cultura do tomateiro, pelos danos causados e pelas dificuldades no controle. Dentre estes destacam-se os nematoides parasitos de plantas, que em muitos casos inviabilizam a produção e o cultivo em áreas infestadas. As plantas de tomateiro quando atacadas severamente pelo nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado e com poucas raízes funcionais. Em altas infestações do nematoide no início da cultura pode ocorrer a morte de mudas no campo, e nas plantas sobreviventes a produção é fortemente afetada em quantidade e qualidade (ALVARENGA, 2004; CHARCHAR & ARAGÃO, 2005).

O controle químico tem seu uso cada vez mais limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento, ou baixa eficácia de controle após repetidas aplicações (DONG & HANG, 2006). Neste sentido, a busca por micro-organismos benéficos, agentes de controle biológico, como alternativa para aumentar a produtividade de plantas e melhorar seu estado fitossanitário, vem sendo um dos principais objetivos da pesquisa agrícola nas últimas décadas. O controle biológico não contamina, não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006; BETTIOL, 2009).

Dentre os micro-organismos com potencial para agentes de controle biológico, destacam-se as actinobactérias que são Gram-positivas, aeróbicas estritas, comumente encontradas no solo, embora também presentes em diferentes ambientes, como aquáticos, pântanos e folhagens em decomposição (OTINIANO et al., 2006). As actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* são mundialmente conhecidos pela produção de antibióticos e enzimas líticas (PADILHA, 1998), que atuam no controle de diversas doenças de plantas (EL-ABYD et al., 1993; SILVA, 1998).

Existe uma grande diversidade de metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias, que pode ter efeito nematicida, a exemplo do terpenóide geosmin (POLLAK & BERGER, 1996). A avermectina tem demonstrado efeito nematicida no controle de *M. incognita*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Tylenchorhynchus dubius* (BLACKBURN et al., 1996; GARABEDIAN & VAN GUNDY, 1983).

Em estudo realizado por Coimbra et al. (2004) de um total de 42 actinobactérias isolados da rizosfera de plantas, 28 foram eficientes em reduzir o número de galhas e 9 reduziram o número de ovos de *M. javanica* em raízes de mudas de tomateiro. Sousa et al., (2006), demonstraram efeito nematicida de metabólitos produzidos por actinobactérias que promoveram 98,2% de mortalidade dos juvenis *in vitro*. Estes autores observaram também que houve redução do número de galhas (68%) e do número de massa de ovos (76,8%) em raízes das mudas de tomateiro produzidas em substrato infestado e incubado com as actinobactérias.

Yan et al. (2004) isolaram uma cultura de *Streptomyces* sp. capaz de controlar a formação de galhas e reduzir o número de J2 de *Meloidogyne incognita*, em condições de casa de vegetação. *Streptomyces costaricanus* reduziu o número de galhas em raízes de pimenteira plantada em solo naturalmente infestado com *M. incognita* e a população de *R. reniformis* em tomateiro e pimenteira (DICKLOW et al., 1993). Metabólitos produzidos por isolados de estreptomicetos foram efetivos no controle do crescimento micelial e germinação de esporos de *Coletotrichum gloeosporioides* e *Curvularia eragrostides* na cultura do inhame (SOARES et al., 2006).

Tendo em vista a importância da cultura do tomateiro e a eficácia dos actinobactérias no controle de fitonematoides, este trabalho teve como objetivos: caracterizar fisiologicamente os isolados de actinobactérias, avaliar o potencial desses isolados na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* sob condições *in vitro* e no controle da meloidoginose nas mudas de tomateiro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção de metabólitos dos actinobactérias

Foram avaliados 42 isolados de actinobactérias provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB. Sendo que 39 isolados foram oriundos do resíduo seco de sisal (AR 5, AR 18, BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 18, BFT 19, BFT 25, BFT 26, BFT 32, BFT 36, BFT 40, BFT 41, BFT 48, BFT 57, BFT 58, BFT 65, BFT 66, BFT 69, BFT 71, BFT 76, BFT 79, BFT 80, BFT 83, BFT 85, BFT 87, BFT 88, BFT 100, BFT 102, BFT 104, BFT 106, BFT 112, BFT C, BFT D, BFT K, BM 18, BM 22, BM 28 e PD3) (Tabela 1) e 3 isolados (AC 50, AC 92 e AC 147) selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento para o tomateiro (LIMA, 2003; SOUSA et al., 2006, PAIXÃO, 2008).

**Tabela 1.** Códigos dos isolados de actinobactérias, de acordo com a origem do resíduo seco do sisal.

Município	Localidade	Sigla
Serrinha	Araci	AR
Campo Formoso	Belas/Morrinhos	BM
Campo Formoso	Baixa do Feijão/Tiquara	BFT
Campo Formoso	Pau D'arco	PD

Os isolados de actinobactérias foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido AGS, as quais foram mantidas em câmara de crescimento tipo B.O.D., à temperatura de 28°C por dez dias. Após este período, 10 discos de 6mm das culturas foram transferidos para meio de cultura líquido AGS e incubados durante 14 dias a 28 ± 2°C, em agitador orbital, a 140rpm. Ao final desse período, as culturas de actinobactérias foram centrifugadas a 15000rpm por 10 minutos para separar as células de actinobactérias (sobrenadante). Esse sobrenadante foi armazenado em tubos de centrifuga em polietileno, com capacidade para 15mL, com tampa de rosca e mantidos em freezer -4°C para testes futuros.

### **Obtenção e desinfestação de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica*:**

Para obtenção dos J2, raízes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada', cultivado em casa de vegetação, inoculadas com *M. javanica*, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 500 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão montada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso. Para a desinfestação dos J2, a suspensão obtida na câmara de eclosão foi transferida para uma peneira de 500 mesh, na qual os J2 ficaram retidos. A peneira com os J2 foi imersa numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 minuto, seguido de quatro lavagens com água destilada esterilizada. Para confirmação da espécie, foi utilizado a isoenzima esterase (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001) e o corte na região perineal das fêmeas adultas (TAYLOR & SASSER, 1978).

### **Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias, produção de quitinase e lipase**

A atividade quitinolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Rewick et al., (1991). As actinobactérias foram multiplicadas em meio mínimo de sais minerais ágar (TUIE, 1969), suplementado com quitina coloidal como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas em câmara B.O.D. a 28°C por 10 dias. Após este período, detectou-se a atividade quitinolítica dos isolados através da visualização de um halo hialino em torno das colônias crescidas.

#### **Produção de lipase**

A produção de lipase pelos isolados de actinobactérias, foi avaliada no meio Sierra (1957), usando Tween 80 como fonte de carbono. Os isolados de actinobactérias foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D., a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 dias. A produção da enzima foi detectada pela formação de um halo branco difuso, constituído de minúsculos precipitados de oleato de cálcio, ao redor das colônias crescidas dos micro-organismos.

### **Avaliação dos metabólitos dos actinobactérias na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica***

Foi instalado um bioensaio em tubos do tipo Eppendorf, esterilizados, com todos os isolados de actinobactérias selecionados anteriormente. Foram adicionados 50 µL de uma suspensão contendo 25 juvenis de *M. javanica*, juntamente com 500 µL de meio de cultura líquido contendo os metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias. Os tubos foram mantidos a 28°C em câmara de crescimento B.O.D. Após 24 e 48 horas de incubação foram contados os nematoides móveis e imóveis, com auxílio do microscópio óptico. Em seguida, os nematoides foram retirados da suspensão de metabólitos e transferidos para água esterilizada, onde permaneceram por mais 24 horas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura de 28°C. Foram considerados mortos os nematoides que depois desse período em água, não recuperaram a mobilidade. Dessa forma, foi avaliada a porcentagem de J2 imóveis e mortos. Nas testemunhas, os J2 foram incubados em água destilada esterilizada e em meio líquido AGS sem cultivo de actinobactérias. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram transformados em  $\arcsin(x/100)^{0,5}$ , submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

### **Infestação e incubação do substrato e do solo com actinobactérias no controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro**

Para avaliar o efeito das actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro, foram selecionados os isolados de actinobactérias que apresentaram melhores resultados nos testes *in vitro*. Foram instalados dois experimentos, sendo utilizado o substrato orgânico Vivatto Slim® no primeiro experimento e, solo no segundo experimento.

No primeiro experimento foram avaliados dezoito isolados, codificados como: BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 19, BFT 25, BFT 26, BFT 41, BFT 58, BFT 66, BFT 71, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 104, BFT 106, BFT K e PD3. Este experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos inteiramente casualizado, com quatorze repetições, em esquema fatorial 18 x 2, sendo dezessete isolados de

actinobactérias e uma testemunha, inoculados com *M. javanica* e sem inoculação com *M. javanica*.

Para o segundo experimento, foram coletadas amostras do horizonte A de solo, na camada de 0 a 20 cm, pertencentes a uma mesma classe, em área de cultivo no município de Cabaceiras do Paraguaçu, BA. Selecionaram-se nove isolados de actinobactérias, codificados como: BFT 4, BFT 26, BFT 41, BFT 71, BFT 87, PD3, AC 50, AC 92 e AC 147. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizado, com 12 repetições em esquema fatorial 10 x 2, com nove isolados de actinobactérias, mais a testemunha, com inoculação e sem inoculação com *M. javanica*.

O solo e substrato foram esterilizados duas vezes em autoclave a 121°C, em dias consecutivos durante 1 hora. A composição química do solo e do substrato utilizados nos experimentos está apresentada nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Caracterização química do substrato Vivatto Slim® utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valor
pH (CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> )		5,1
Umidade a 65°C	%	39,0
Relação C/N		61,1
Carbono Orgânico	%	27,9
Matéria Orgânica	%	48,1
N –total	g/kg	2,8
P-total	mg/dm <sup>3</sup>	1677,0
K	cmolc/dm <sup>3</sup>	6,2
Ca	cmolc/dm <sup>3</sup>	23,7
Mg	cmolc/dm <sup>3</sup>	140,7
S	mg/dm <sup>3</sup>	2300,0
B	mg/dm <sup>3</sup>	28,0
Zn	mg/dm <sup>3</sup>	40,0
Fe	mg/dm <sup>3</sup>	6953,0
Mn	mg/dm <sup>3</sup>	215,8
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	8,0
Ni	mg/dm <sup>3</sup>	140,0

Extratores: P, K, Ni e micronutrientes: Mehlich I; S: Fosfato monobásico de cálcio; B: água quente.

**Tabela 3.** Caracterização química do solo utilizado no experimento.

Característica	Unidade	Valor
pH (CaCl <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> )		4,5
SB	cmolc/dm <sup>3</sup>	24,4
CTC	cmolc/dm <sup>3</sup>	54,2
V	%	45
Matéria Orgânica	g.dm <sup>3</sup>	16
P	mg/dm <sup>3</sup>	11
K	cmolc/dm <sup>3</sup>	2,4
Ca	cmolc/dm <sup>3</sup>	11
Mg	cmolc/dm <sup>3</sup>	11

Métodos: M. O.- Dicromato/Colorimétrico; P, K, Ca e Mg - Resina trocadora de íons

Para produção do inóculo, os isolados de actinobactérias preservados em glicerol 20% a temperatura de -18°C foram cultivados em meio de cultura AGS sólido (POTER, 1960) e incubados por um período de 10 a 12 dias, em câmara de crescimento tipo B.O.D., a temperatura 28 ± 2°C. Em seguida, 10 discos de 6mm de diâmetro da cultura das actinobactérias foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado (SOARES et al., 2007), sendo estes incubados a 30°C por 14 dias. Para quantificação do número de unidades formadoras de colônias das actinobactérias no arroz colonizado, foi adotado o método de diluição seriada do inóculo e plaqueamento em meio AGS sólido, conforme descrito abaixo, com incubação a 28 ± 2°C por 3 dias, até a obtenção do crescimento das colônias para contagem destas. O substrato foi infestado com a suspensão de actinobactérias na proporção de 20g de arroz colonizado para 16L de substrato, fazendo-se o ajuste das UFC/g arroz colonizado. Posteriormente, foi feito o cálculo de acordo com a contagem de UFC e a quantidade de arroz colonizado na suspensão, adotando-se como padrão o isolado (PD3) que apresentou a maior quantidade de UFC/g arroz colonizado.

Para infestação, 20g do arroz colonizado foi colocado em sacos de plástico descartável com capacidade para 1 litro, sendo adicionados 100mL de água destilada esterilizada e agitado para permitir o desprendimento das actinobactérias do arroz. Essa suspensão foi adicionada ao substrato, com agitação manual para distribuição e homogeneização do inóculo. Os substratos infestados foram mantidos em sacos de polietileno e incubados por um período de 40 dias a temperatura ambiente, mantendo-se a umidade constante, com adição de água esterilizada. O tratamento

testemunha foi formado por substrato incubado nas mesmas condições de umidade e temperatura, mas sem infestação com actinobactérias.

Após incubação, foi realizada semeadura do tomateiro foi realizada colocando-se três sementes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada' em sacos de muda pretos de polietileno com capacidade para 1 kg de solo (15 x 0,9 cm). O desbaste foi realizado uma semana após a germinação, deixando-se uma planta por saco. Quinze dias após a germinação das sementes de tomateiro, foi feita a inoculação das mudas com cerca de 1000 juvenis (J2) e 2000 ovos por planta de *M. javanica*, fazendo orifícios no solo e/ou substrato e colocando o inóculo em contato com as raízes, com o auxílio de uma micropipeta de 1mL. Aos 35 dias após a inoculação com *M. javanica*, foi realizada a coleta das plantas, avaliando-se a altura das plantas e diâmetro do caule à altura dos cotilédones. Em seguida, parte aérea e raízes foram separadas, sendo as raízes lavadas em água corrente e em seguida colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Para a contagem do número de massa de ovos e galhas, amostras de raízes frescas foram separadas e coloridas por imersão em solução de fucsina ácida a 0,15 %, durante 20 minutos.

### **Quantificação das actinobactérias no solo, substrato e no arroz colonizado**

Foi determinada a densidade populacional de actinobactérias no arroz, solo ou substrato infestado por 40 dias, utilizando a técnica da diluição seriada, onde amostras de 10g do substrato foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 90mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada e agitada por 20 minutos em agitador orbital. Em seguida, foram realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina esterilizada, obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Foi realizado o plaqueamento de 100µl das diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  em meio AGS sólido (*Arginine-Mineral Salt Agar*), com três repetições para cada diluição, sendo o inóculo espalhado com auxílio da alça de Drigalski esterilizada por flambagem. O meio de cultura recebeu ciclohexamida na concentração de 100µg/mL para inibição do crescimento de fungos. Para o crescimento dos actinobactérias, as placas foram incubadas por 5 a 7 dias a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  em câmara de crescimento tipo B.O.D. As populações de actinobactérias no solo e substrato foram estimadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e o cálculo com base na seguinte formula:  $\text{UFC.g}^{-1} \text{ solo seco} = N \times 10 \times F \times Y$ ,



sendo: N = média do número de colônias das três repetições, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 $\mu$ L de suspensão por placa para 1 mL de suspensão), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$ , em que x corresponde ao número de UFC. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

A quantificação da densidade populacional de actinobactérias no solo e/ou substrato foi realizada aos 40 dias após a incubação e repetida após a coleta do experimento (das plantas de tomateiro). Para a quantificação das actinobactérias no arroz colonizado, utilizou-se a mesma metodologia. Porém, não foi utilizado a ciclohexamida e a quantificação da densidade populacional foi realizada aos três dias após a incubação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias

Do total de 42 isolados avaliados, 71,4% e 92,8% demonstraram ser produtores das enzimas quitinase e lipase, respectivamente (Tabela 4).

As quitinases produzidas por muitos organismos, entre eles as actinobactérias, são enzimas hidrolíticas com a propriedade de hidrolisar a quitina em oligômeros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e metabolizados, sendo um dos mecanismos utilizado no biocontrole de nematoides, pela destruição da cutícula do nematoide (GOODAY et al., 1992; PARK et al., 2002). No solo, a decomposição da quitina libera substâncias tóxicas a fitonematoides como a amônia, uma vez que essa macromolécula possui teor elevado de nitrogênio. Além disso, a quitina serve como substrato e fonte de energia para as actinobactérias, permitindo a esses organismos competir com mais eficiência com outros micro-organismos do solo e da rizosfera.

As lipases são importantes no controle de nematoides por degradarem as reservas energéticas dos nematoides e por atuar nos lipídios de membrana. Os J2 de *M. javanica* após eclosão possuem 30% do seu peso corporal em lipídios, como fonte de reserva energética, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo na

planta (ARDUIM, 2006; ROCHA, 2007), micro-organismos produtores de lipases, são importantes no biocontrole. Miller & Sands (1977), testando os efeitos *in vitro* das enzimas protease, lipase e quitinase sobre *Tylenchorhynchus dubius*, observaram que após 24 horas houve modificações estruturais na cutícula do nematoide, devido a uma provável degradação enzimática.

**Tabela 4.** Produção de enzimas extracelulares, pelos isolados de actinobactérias

Isolados	Enzimas extracelulares		Isolados	Enzimas extracelulares	
	Quitinase	Lipase		Quitinase	Lipase
AC 50	-	+	BFT 58	+	+
AC 92	+	-	BFT 65	+	-
AC 147	+	+	BFT 66	-	+
AR 5	-	+	BFT 69	+	+
AR 18	-	+	BFT 71	+	+
BFT C	+	+	BFT 76	+	+
BFT D	-	-	BFT 79	+	+
BFT K	+	+	BFT 80	+	+
BFT 4	+	+	BFT 83	-	+
BFT 7	-	+	BFT85	+	+
BFT11	-	+	BFT 87	+	+
BFT 18	-	+	BFT 88	+	+
BFT 19	+	+	BFT 100	-	+
BFT 25	+	+	BFT 102	+	+
BFT 26	+	+	BFT 104	+	+
BFT 32	+	+	BFT 106	+	+
BFT 36	+	+	BFT 112	+	+
BFT 40	+	+	BM 18	-	+
BFT 41	+	+	BM 22	-	+
BFT 48	+	+	BM 28	+	+
BFT 57	+	+	PD3	+	+

Os sinais indicam resposta positiva (+) ou negativa (-) em relação à produção de enzimas extracelulares (quitinase e lipase).

#### **Avaliação dos metabólitos das actinobactérias na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica***

Metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias testados reduziram a mobilidade e causaram mortalidade de juvenis de *M. javanica* ( $P \leq 0,05$ ), quando comparados às testemunhas com água ou meio líquido AGS (Tabela 5). A imobilidade de J2 de *M. javanica* acima de 50% foi verificada por metabólitos de 32 isolados de actinobactérias após 24 horas, quando comparados às testemunhas em que os J2 foram incubados em água ou em meio líquido AGS.

Após 48 de exposição, metabólitos de 31 isolados mantiveram o efeito nematostático sobre os J2 de *M. javanica*. Verificou-se que os metabólitos de seis isolados (BM 22, BFT 83, BFT 76, BFT 69, BFT 18 e BFT C) apresentaram efeito nematostático apenas com 48 horas de exposição, enquanto que o metabólito produzido pelo isolado AR 18 apresentou efeito nematostático sobre os J2 somente durante 24 horas de exposição (Tabela 4).

Foi comprovado o efeito nematicida de metabólitos produzidos por 34 isolados de actinobactérias, sendo observada taxa de mortalidade dos J2 acima de 50%. Os metabólitos produzidos pelos isolados AR 5, BFT 48, BFT 80 e BM 18 apresentaram efeito apenas nematostático, uma vez, que os nematoides, quando transferidos para água, retomaram a mobilidade.

Os isolados de actinobactérias que causaram as maiores percentagens de mortalidade do nematoide *M. javanica* foram: BFT 4, BFT 11, BFT 41, BFT 100, PD3, BFT 58, BFT 25, BFT 76, que apresentaram 88,85%, 87,27%, 86,85%, 86,57%, 86,12%, 85,75%, 85,57% e 84,12%, respectivamente (Tabela 5).

A imobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* aumentaram em todos os filtrados bacterianos testados, quando se aumentou o período de exposição de 24 para 48 horas (NAVES et al., 2004). Coimbra & Campos (2005), ao avaliar o efeito de exsudatos de actinobactérias na motilidade e mortalidade de juvenis de *M. javanica*, observaram que 6 isolados entre os 37 testados, promoveram efeito nematicida, com valores de mortalidade entre 19 e 100%. Sousa et al., (2009) avaliaram o efeito de actinobactérias no controle do nematoide *Scutellonema bradys* em túberas de inhame e verificaram que metabólitos produzidos pelos isolados de actinobactérias promoveram até 100% de mortalidade dos nematoides. Houve inibição parcial ou total do movimento de *M. incognita* causada por 50 rizobactérias em testes *in vitro* (BECKER et al., 1988).

Substâncias produzidas *in vitro* por fungos e bactérias têm sido reportadas inibindo a eclosão, afetando a motilidade e causando mortalidade em fitonematoides (COSTA, 2001). O efeito dos metabólitos secundários na motilidade e mortalidade dos nematoides variam de acordo com o isolado de actinobactéria. Além disso, diferença intrínseca entre as espécies de actinobactérias, bem como outras características do meio de crescimento, (pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes), pode interferir tanto na quantidade quanto na composição dos

metabólitos produzidos (MOURA et al., 1998). Estas características podem ter influenciado, em parte, o diferente grau de mortalidade proporcionado pelos isolados de actinobactérias testados.

**Tabela 5.** Efeito de metabólitos de actinobactérias na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. javanica* após 24, 48 e 72 horas de exposição.

Isolados de actinobactérias	Juvenis do segundo estágio (J2) de <i>M. javanica</i>		
	Imóveis (%)		Mortos (%)
	24 h	48 h	72 h
Testemunha (Água)	0,00 i*	0,00 h	4,27 h
Testemunha (AGS)	6,20 h	8,25 g	11,57 g
AC 50	67,85 b	69,72 c	73,70 c
AC 92	70,05 b	71,85 c	78,80 b
AC 147	76,20 b	82,15 b	63,72 d
AR 5	60,67 d	63,80 c	48,07 e
AR 18	55,12 d	49,65 d	49,10 e
BFT C	31,30 f	81,30 b	74,20 c
BFT D	64,65 c	88,00 a	81,92 b
BFT K	67,85 c	89,30 a	78,80 c
BFT 4	77,75 b	80,75 b	88,85 a
BFT 7	77,05 b	87,85 a	72,97 c
BFT11	78,52 b	84,07 a	87,27 a
BFT 18	42,80 e	57,45 d	67,82 d
BFT 19	72,40 b	84,30 a	77,00 b
BFT 25	58,20 d	88,85 a	85,57 a
BFT 26	83,45 a	79,35 b	63,92 d
BFT 32	59,57 d	77,15 b	64,52 d
BFT 36	65,20 c	69,45 c	75,12 c
BFT 40	65,27 c	51,37 d	69,77 c
BFT 41	73,95 b	85,97 a	86,85 a
BFT 48	57,58 d	69,75 c	40,12 e
BFT 57	25,45 f	19,47 f	19,32 f
BFT 58	71,25 b	79,35 b	85,75 a
BFT 65	12,12 g	35,30 e	43,62 e
BFT 66	79,05 b	78,20 b	81,82 b
BFT 69	40,95 e	67,85 c	67,52 d
BFT 71	51,65 d	88,67 a	76,97 b
BFT 76	45,92 d	73,57 c	84,12 a
BFT 79	57,05 d	89,25 a	81,92 b
BFT 80	25,37 f	32,00 e	62,37 d
BFT 83	30,15 f	65,52 c	78,97 b
BFT85	20,22 f	28,92 e	50,80 e
BFT 87	89,55 a	76,72 b	75,37 c
BFT 88	72,90 b	78,12 b	77,15 b
BFT 100	66,65 c	66,72 c	86,57 a
BFT 102	78,97 b	69,92 c	80,05 b
BFT 104	71,25 b	74,32 b	64,87 d
BFT 106	71,45 b	76,62 b	81,37 b
BFT 112	72,10 b	62,22 c	59,87 d
BM 18	56,60 d	64,92 c	49,85 e
BM 22	24,32 f	77,87 b	68,42 d
BM 28	53,00 d	51,97 d	71,92 c
PD3	84,25 a	85,12 a	86,12 a
CV(%)		8,58	

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

### Efeito da infestação e incubação de substrato orgânico com actinobactérias no controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro

Houve diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) para o número de galhas e massa de ovos das raízes das mudas de tomateiro cultivadas no substrato em relação à testemunha (Tabela 6).

Dos 17 isolados de actinobactérias avaliados, 11 promoveram redução de até 42,7% (BFT 104) no número de galha/planta em relação à testemunha inoculada com nematoides. Os isolados de actinobactérias BFT 7, BFT 26, BFT 41, BFT 58, BFT 66, BFT 71, BFT 88, BFT 104, BFT 106 e PD3 promoveram redução do número de galhas, diferindo estatisticamente da testemunha.

**Tabela 6.** Efeito de actinobactérias no número de galhas e massa de ovos nas mudas de tomateiro, cultivadas no substrato Vivatto Slim®.

Isolado	Número de Galhas (NG)				Massa de ovos(MO)			
	NG/planta	Redução NG/planta (%)	NG/g raiz	Redução NG/g raiz (%)	MO/planta	Redução MO/planta (%)	MO/g raiz	Redução MO/g raiz (%)
Testemunha	107,42 a	-	5,74 a	-	102,71 a	-	4,84 a	-
BFT 4	95,28 b	11,30	4,12 a	28,22	40,14 c	61,00	2,54 b	47,52
BFT 7	81,71 b	23,93	2,51 b	56,27	58,85 c	42,70	1,84 c	61,98
BFT 11	113,71 a	-	3,69 a	35,71	65,42 b	36,30	2,15 b	55,58
BFT 19	149,28 a	-	4,36 a	24,04	105,28 a	-	2,91 b	39,87
BFT 25	117,00 a	-	3,58 a	37,63	74,14 b	27,81	2,26 b	53,30
BFT 26	76,00 b	29,25	2,62 b	54,35	38,71 c	62,31	1,39 c	71,28
BFT 41	85,42 b	20,48	2,71 b	52,78	50,85 c	50,49	1,60 c	66,94
BFT 58	111,00 a	-	3,04 b	47,03	77,57 b	24,47	2,14 b	55,78
BFT 66	64,42 b	40,03	2,73 b	52,44	53,28 c	48,12	2,34 b	51,65
BFT 71	90,28 b	15,95	3,02 b	47,38	68,57 b	33,24	2,51 b	48,14
BFT 87	63,85 b	40,56	6,87 a	-	47,71 c	53,55	1,88 c	61,15
BFT 88	77,71 b	27,65	2,48 b	56,79	51,42 c	49,93	1,62 c	66,53
BFT 102	104,71 a	-	3,79 a	33,97	44,71 c	56,47	1,64 c	66,11
BFT 104	61,57 b	42,68	2,17 b	62,20	32,42 c	68,43	1,14 c	76,44
BFT 106	89,71 b	16,48	2,86 b	50,17	61,00 c	40,61	1,84 c	61,98
BFT K	131,14 a	-	3,52 a	38,67	102,57 a	-	2,69 b	44,42
PD3	67,71 b	37,97	2,19 b	61,84	39,14 c	61,89	1,26 c	73,96
CV(%)	15,11		21,82		19,32		15,56	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Quanto à massa de ovos/planta, com exceção, dos isolados de actinobactérias BFT 19 e BFT K, todos os isolados reduziram a massa de ovos/planta comparando com a testemunha. Os isolados PD3, BFT 26 e BFT 104 reduziram a massa de ovos/planta nas raízes de tomateiro em 61,9%, 62,3% e 68,4%, respectivamente. Em relação à massa de ovos/grama de raiz, todos os isolados apresentaram efeito nematicida, com destaque para os isolados BFT 26

(71,2%), PD3 (73,9%) e BFT 104 (76,4%) diferindo da testemunha (Tabela 6). O isolado BFT 104 se destacou entre os demais, com as maiores percentagens de redução do número de galhas/plantas, galhas/g raiz, massa de ovos/planta e massa de ovos/g raiz.

Coimbra & Campos (2010) estudando a ocorrência de actinobactérias em rizosfera de ervas daninhas e gramíneas e seus efeitos antagônicos sobre *M. javanica*, verificaram que cerca de dez isolados de actinobactérias testados reduziram o número de galhas e massa de ovos por grama de raiz de tomateiro. Isolados de *Streptomyces* sp. reduziram em 52,8 % e 63,5% a formação de galhas e massa de ovos de *M. incognita*, respectivamente (YAN et al., 2004).

Sousa et al. (2006) observaram que a redução do número de massa de ovos de nematoides em raízes de tomate foi proporcionada por pela infestação e incubação do substrato de cultivo com actinobactérias. Jonathan et al. (2000) relataram reduções no número de galhas e número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro quando infestadas com isolados de actinobactérias.

O substrato utilizado foi infestado e incubado por 40 dias antes do plantio com as actinobactérias. Durante a incubação, pode ter ocorrido a produção de enzimas extracelulares e metabólitos secundários no substrato, causando a redução na infectividade dos nematoides nas raízes de tomateiro. A quantificação dos isolados de actinobactérias no substrato Vivatto Slim®, aos 40 dias após infestação e incubação e após a coleta das mudas, demonstrou que a densidade populacional dos isolados foi superior ao tratamento testemunha (não infestado) (Tabela 7).

Houve aumento na população de actinobactérias após a coleta das mudas de tomateiro em quase todos os tratamentos, com exceção dos tratamentos incubados e infestados com os isolados de actinobactérias BFT 71, BFT 88 e BFT 106. Contudo, tanto na população inicial quanto na final houve um aumento significativo em relação à testemunha (Tabela 7). Estes resultados indicam que as actinobactérias cresceram e colonizaram o substrato, produzindo substâncias com efeito nematostático e nematicida.

**Tabela 7.** Densidade populacional de actinobactérias no substrato Vivatto Slim® aos 40 dias após incubação e após a coleta das mudas de tomateiro.

Densidade populacional de actinobactérias (UFC. g <sup>-1</sup> de substrato)		
Tratamento	Antes do plantio	Após coleta
Testemunha	0,26 x 10 <sup>5</sup> Bg	0,36 x 10 <sup>5</sup> Ag
BFT 4	0,71 x 10 <sup>5</sup> Bf	2,39 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 7	3,00 x 10 <sup>6</sup> Ac	4,01 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 11	1,82 x 10 <sup>6</sup> Ad	2,10 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 19	1,23 x 10 <sup>6</sup> Be	1,01 x 10 <sup>7</sup> Aa
BFT 25	1,50 x 10 <sup>6</sup> Bd	2,56 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 26	1,19 x 10 <sup>6</sup> Be	7,30 x 10 <sup>6</sup> Ab
BFT 41	4,29 x 10 <sup>6</sup> Ab	3,92 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 58	1,12 x 10 <sup>6</sup> Be	2,89 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 66	1,69 x 10 <sup>6</sup> Bd	6,85 x 10 <sup>6</sup> Ab
BFT 71	4,46 x 10 <sup>6</sup> Ab	2,78 x 10 <sup>6</sup> Bd
BFT 87	2,43 x 10 <sup>6</sup> Ac	3,02 x 10 <sup>6</sup> Ad
BFT 88	6,96 x 10 <sup>6</sup> Aa	3,90 x 10 <sup>6</sup> Bc
BFT 102	1,54 x 10 <sup>6</sup> Bd	1,06 x 10 <sup>7</sup> Aa
BFT 104	0,79 x 10 <sup>5</sup> Bf	4,09 x 10 <sup>6</sup> Ac
BFT 106	3,76 x 10 <sup>6</sup> Ab	1,91 x 10 <sup>6</sup> Bd
BFT K	2,26 x 10 <sup>6</sup> Bc	2,92 x 10 <sup>6</sup> Ad
PD3	1,06 x 10 <sup>6</sup> Be	2,49 x 10 <sup>6</sup> Ad
CV(%)	13,7	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do período de incubação (aos 40 dias após incubação e após a coleta do experimento) para o mesmo isolado de actinobactéria. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactéria entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Não houve interação significativa entre a infestação do substrato com os isolados e a inoculação ou não com nematoides, para altura das plantas, diâmetro caulinar e massa seca da parte aérea. Entretanto, apresentou interação para a massa seca das raízes (Tabela 8).

A altura das plantas e a produção de massa seca da parte aérea do tomateiro não foram influenciadas pela presença dos isolados de actinobactérias quando inoculados ou não com os nematoides (Tabela 8). Houve diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) quanto ao diâmetro caulinar das mudas inoculadas e sem inoculação com nematoides, com incrementos de até 21,01% (BFT 58) das mudas de tomateiro inoculadas com *M. javanica*.

Quanto ao desenvolvimento radicular do tomateiro, observou-se que os tratamentos infestados com actinobactérias e inoculados com nematoides, proporcionaram produção de massa radicular superior aos tratamentos sem inoculação para 11 isolados (Tabela 8).

**Tabela 8.** Altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) das mudas de tomateiro produzidas em substrato Vivatto Slim® infestado com isolados de actinobactérias e inoculados ou não com nematoides.

Isolado	Altura (cm)		Diâmetro (mm)		MSPA (g)		MSR (g)	
	SI*	CI	SI	CI	SI	CI	SI	CI
Testemunha	96,14 Aa	90,42 Aa	5,85 Ab	6,14 Ab	9,82 Aa	10,73 Aa	0,83 Bc	1,33 Ab
BFT 4	92,14 Aa	94,28 Aa	6,00 Ab	6,71 Aa	9,91 Aa	10,54 Aa	1,22 Ab	1,31 Ab
BFT 7	95,28 Aa	89,42 Aa	6,85 Aa	7,00 Aa	9,44 Aa	9,54 Ab	1,45 Aa	1,61 Ab
BFT 11	93,57 Aa	89,14 Aa	5,57 Ab	6,14 Ab	10,10 Aa	10,78 Aa	1,22 Bb	1,86 Aa
BFT 19	90,00 Aa	90,42 Aa	6,14 Ab	6,57 Aa	10,10 Aa	9,97 Ab	1,22 Bb	1,85 Aa
BFT 25	86,85 Aa	92,71 Aa	6,14 Ab	6,00 Ab	9,55 Aa	10,05 Ab	1,14 Bb	1,70 Aa
BFT 26	91,00 Aa	91,71 Aa	6,85 Aa	6,57 Aa	10,39 Aa	10,84 Aa	1,26 Ab	1,51 Ab
BFT 41	89,71 Aa	92,71 Aa	6,00 Ab	6,71 Aa	9,68 Aa	10,19 Ab	1,45 Ba	1,81 Aa
BFT 58	91,42 Aa	93,28 Aa	6,57 Aa	7,14 Aa	9,77 Aa	10,15 Ab	1,15 Bb	1,96 Aa
BFT 66	92,28 Aa	93,28 Aa	5,85 Ab	5,42 Ab	9,72 Aa	10,53 Aa	1,22 Ab	1,35 Ab
BFT 71	89,28 Aa	94,57 Aa	5,85 Ab	5,85 Ab	9,56 Aa	9,86 Ab	1,15 Bb	1,43 Ab
BFT 87	88,85 Aa	95,42 Aa	6,00 Ab	5,85 Ab	9,27 Aa	9,82 Ab	1,46 Aa	1,28 Ab
BFT 88	93,85 Aa	89,71 Aa	5,85 Ab	6,57 Aa	9,64 Aa	9,58 Ab	1,34 Ba	1,77 Aa
BFT 102	90,85 Aa	91,72 Aa	6,42 Aa	6,42 Aa	10,42 Aa	11,18 Aa	1,25 Ab	1,51 Ab
BFT 104	88,57 Aa	94,71 Aa	7,00 Aa	6,57 Aa	9,80 Aa	8,85 Ab	1,28 Aa	1,52 Ab
BFT 106	86,00 Aa	93,28 Aa	6,42 Aa	6,57 Aa	9,93 Aa	10,14 Ab	1,36 Ba	1,83 Aa
BFT K	87,57 Aa	88,14 Aa	5,57 Ab	6,28 Ab	9,71 Aa	9,26 Ab	1,36 Ba	1,88 Aa
PD3	90,57 Aa	91,85 Aa	5,85 Ab	6,42 Aa	9,50 Aa	10,76 Aa	1,13 Bb	1,52 Ab
CV(%)	7,50		12,41		11,27		17,31	

\*SI – sem inoculação com nematoides; CI – com inoculação com nematoides. Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do mesmo isolado de actinobactéria quando inoculado ou não com nematoides. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactéria nos substratos inoculados ou não com nematoides. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

O aumento no desenvolvimento do sistema radicular das plantas de tomateiro, na presença dos nematoides, pode ser explicado pela maior disponibilização de nutrientes no substrato para serem absorvidos pelas raízes das plantas, favorecendo a formação de raízes secundárias, o que contribuiu para um melhor desenvolvimento do sistema radicular e uma maior infecção e formação de galhas.

Abrão & Mazzafera (2001) ao avaliar o efeito do nível de inóculo de *M. incognita* no algodoeiro, verificaram que houve aumento na massa radicular seca das plantas quando inoculadas com os nematoides. Alguns autores sugerem que esse aumento seria a consequência de efeito combinado da emissão de novas raízes secundárias, nos locais de infecção do nematoide (HUTANGURA et al., 1999) e também pela formação de galhas (ABRÃO & MAZZAFERA, 2001; CARNEIRO, 2000; CARNEIRO et al., 1999).



### **Efeito da infestação e incubação do solo com actinobactérias no controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro**

Neste experimento, foi utilizado solo esterilizado infestado e incubado com os isolados de actinobactérias por 40 dias na produção das mudas de tomateiro. Houve diferença significativa no número de galhas e massa de ovos nas raízes de tomateiro em relação à testemunha sem infestação com actinobacterias e inoculadas com *M. javanica* (Tabela 9).

Com exceção dos isolados de actinobacterias AC 50 e BFT 71, os demais reduziram em até 51% (BFT 4) o número de galhas/planta diferindo estatisticamente da testemunha. Os isolados de actinobactérias BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3, causaram significativa redução no número de galhas/g de raiz.

A massa de ovos/planta foi menor nas raízes infestadas com os isolados AC 92, AC147, BFT 4, BFT 26, BFT 41 e BFT 87. Ao avaliar a massa de ovos/g de raiz, houve redução significativa, contudo, os resultados diferiram um pouco daqueles encontrados na massa de ovos/planta, com destaque para os isolados AC 92, BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3 (Tabela 9).

A maior redução no nível de dano (número de galhas e massa de ovos) no solo, foi verificada com o isolado BFT 4 com 51,0%, 73,7%, 49,4% e 72,8% no número de galhas/planta, número de galhas/g raiz, massa de ovos/planta e massa de ovos/g de raiz, respectivamente, diferindo estatisticamente da testemunha.

Nos testes *in vitro*, observou-se que os isolados avaliados neste experimento produziram metabólitos secundários, com efeito, nematicida. Estes resultados foram confirmados nos testes *in vivo* com os isolados AC 92, BFT 4, BFT 41 e BFT 87 que reduziram o número de galhas/planta, número de galhas/g de raiz, a massa de ovos/planta e massa de ovos/g de raiz das mudas de tomateiro. Os isolados AC 147 e PD3 também apresentaram bons resultados nestas avaliações, porém, não diferiram da testemunha quanto ao número de galhas/g de raiz e massa e ovos/planta, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 9.** Efeito de isolados de actinobactérias no número de galhas e no número de massa de ovos, nas mudas de tomateiro cultivadas em solo.

Isolados	Número de Galhas (NG)				Massa de ovos (MO)			
	NG/planta	Redução NG/planta (%)	NG/g raiz	Redução NG/g raiz (%)	MO/planta	Redução MO/planta (%)	MO/g raiz	Redução MO/g raiz (%)
Testemunha	65,8 b	-*	11,7 b	-	54,6 b	-	9,9 b	-
AC 50	65,8 b	-	8,2 b	29,6	60,3 b	-	6,5 b	34,6
AC 92	48,6 c	26,1	4,5 c	38,9	41,2 c	13,5	4,4 c	55,5
AC 147	45,0 c	31,6	10,7 b	8,50	35,3 d	35,3	8,3 b	16,2
BFT 4	32,3 c	51,0	3,1 c	73,7	27,6 d	49,4	2,7 c	72,8
BFT 26	50,5 c	23,2	17,9 a	-	51,0 b	6,6	16,2 a	-
BFT 41	47,3 c	28,1	4,4 c	62,3	38,3 c	29,8	3,5 c	64,5
BFT 71	101,6 a	-	9,5 b	18,8	79,5 a	-	7,3 b	26,0
BFT 87	46,5 c	29,3	4,4 c	62,0	39,3 c	28,0	3,7 c	62,4
PD 3	63,3 c	3,80	5,4 c	53,4	56,3 b	-	4,8 c	49,1
CV (%)	13,2		24,8		12,8		26,2	

Letras iguais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*Não houve redução no número de galhas e massa de ovos em relação à testemunha.

Algumas rizobactérias produzem metabólitos tóxicos que causam inibição do movimento de nematoides *in vitro*, enquanto outras inibem a eclosão de juvenis e o processo pelo qual eles penetram as raízes (STIRLING, 1991). A inibição total ou parcial do movimento de *M. incognita* causada por cerca de 50 rizobactérias em testes *in vitro* foi observada por Becker et al. (1988). Estes autores relataram que, destas bactérias, 20% reduziram significativamente o número de galhas em plantas de pepino, demonstrando a importância deste modo de ação.

Sousa et al. (2006), ao avaliar o efeito de isolados de actinobactérias, verificaram que o mesmo reduziu significativamente o número de galhas e massa de ovos por grama de raiz nas mudas de tomateiro inoculadas com *M. incognita*. Krechel et al. (2002), depois de testar isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, obtidos da rizosfera da batateira, visando ao controle de *M. incognita* em casa de vegetação, observaram redução no número de galhas entre 50% e 85% e redução no número de massas de ovos entre 40% e 100%, quando comparados com a testemunha. Oka et al. (1993) relataram atividade nematicida de *Bacillus cereus* sobre ovos e juvenis, e a exposição do nematoide a essa bactéria inibiu a penetração do parasita nas raízes de tomateiro.

A orientação e a migração de fitonematoides para raízes dependem de vários fatores, entre eles a natureza dos exsudados radiculares. Os micro-organismos, por sua vez, colonizam o sistema radicular e afetam a composição química dos

exsudados liberados (MELO, 1998). Khan et al. (2007) demonstraram que o tratamento de sementes de feijão com *B. subtilis* também resultou na supressão de formação de galhas e reprodução do nematoide infestado no solo. Outro possível mecanismo de biocontrole consiste no parasitismo pelos actinobactérias, os quais utilizam de enzimas como proteases, quitinases e lipases que atuam na destruição da cutícula dos nematoides (PARK et al., 2002).

Alguns dos isolados de actinobactérias testados nos dois experimentos (substrato e solo) demonstraram nos testes *in vitro* capacidade de produzir as enzimas quitinase e lipase (Tabela 4). A quitinase é uma enzima frequentemente produzida por antagonistas (MANJULA et al., 2004; ARORA et al., 2007) e tem como finalidade a degradação da parede celular de fungo ou a cutícula do nematoide, sendo um mecanismo relacionado ao biocontrole e quando secretada por bactérias promotoras de crescimento, pode reduzir o crescimento de fitopatógenos presentes na região rizosférica (COMPANT et al., 2009).

O nematoide traz consigo 30% de seu peso corporal em lipídios, constituindo-se a principal fonte energética para os gastos no processo de penetração e parasitismo do hospedeiro (FREIRE et al., 2007). Segundo estes autores, a perda dessas reservas reduz a infectividade e a reprodução, podendo levar a morte. Quando há redução de 50% a 60% das reservas energéticas lípidicas de J2 de *Meloidogyne* spp., há uma redução substancial do seu potencial infectivo. No solo a movimentação do juvenil (J2) de *Meloidogyne* spp. em direção ao local de penetração ocorre, entre outros fatores, em resposta a por substância exsudadas pela raiz (ROCHA, 2007).

As lipases são importantes no controle de nematoides por degradarem as reservas energéticas dos nematoides e por atuar nos lipídios de membrana (ARDUIM, 2006; ROCHA, 2007).

Todos os isolados de actinobactérias apresentaram densidade populacional das actinobactérias após o período de incubação por 40 dias, superior ao tratamento testemunha, com destaque para os isolados BFT 4, BFT 41, AC 92, AC 50 e PD3. Estes isolados apresentam capacidade de utilizar os nutrientes do solo e/ou exsudatos radiculares para o seu crescimento, favorecendo o seu estabelecimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetativo (Tabela10).

**Tabela 10.** Densidade populacional de actinobactérias solo aos 40 dias após incubação e após a coleta das mudas de tomateiro.

Densidade populacional de actinobactérias (UFC.g <sup>-1</sup> de solo seco)		
Tratamento	Antes do plantio	Após coleta
Testemunha	4,10 x 10 <sup>5</sup> Ae	3,20 x 10 <sup>5</sup> Ac
AC 50	9,10 x 10 <sup>5</sup> Bc	1,54 x 10 <sup>6</sup> Aa
AC 92	4,87 x 10 <sup>6</sup> Aa	1,96 x 10 <sup>6</sup> Ba
AC 147	2,30 x 10 <sup>5</sup> Bf	9,30 x 10 <sup>5</sup> Ab
BFT 4	9,70 x 10 <sup>5</sup> Bc	2,15 x 10 <sup>6</sup> Aa
BFT 26	7,20 x 10 <sup>5</sup> Ad	9,00 x 10 <sup>5</sup> Ab
BFT 41	1,88 x 10 <sup>6</sup> Ab	1,75 x 10 <sup>6</sup> Aa
BFT 71	5,60 x 10 <sup>5</sup> Ad	6,46 x 10 <sup>5</sup> Ab
BFT 87	9,30 x 10 <sup>5</sup> Ac	9,03 x 10 <sup>5</sup> Ab
PD3	1,87 x 10 <sup>6</sup> Ab	2,07 x 10 <sup>6</sup> Aa
CV(%)	14,4	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do período de incubação (aos 40 dias após incubação e após a coleta do experimento) para o mesmo isolado de actinobactéria e letras minúsculas na coluna comparam os isolados de actinobactérias entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As populações microbianas, pela diversidade de substratos metabólicos que podem utilizar, podem variar de cultivar para cultivar, em função das diferenças na exsudação radicular. Genótipos vegetais e micro-organismos rizosféricos variam em sua interação, diferentes solos ou substratos levam as alterações metabólicas importantes que podem influenciar a maneira como plantas e micro-organismos interagem. Se houver uma alteração no padrão exsudativo da planta, o mesmo isolado e o mesmo genótipo vegetal podem interagir de maneira diferente (NANÔ, 2003). Freitas et al. (2003) observaram instabilidade nos efeitos dos isolados fluorescentes de *Pseudomonas* sp. sobre plantas de alface, atribuindo essa variação, pelo menos em parte, às mudanças ocasionadas pelos diferentes substratos usados.

Houve interação significativa entre o substrato infestado com isolados de actinobactérias e inoculação ou não com nematoides para a altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca da parte aérea e das raízes de plantas de tomateiro (Tabela 11).

Para a altura das plantas, as mudas de tomateiro do tratamento testemunha e infestadas com o isolado BFT 26 (ambos sem inoculação com nematoides) apresentaram desenvolvimento superior às inoculadas. Entretanto, para os demais isolados, não houve interação significativa (Tabela 11). No diâmetro caulinar, não houve interação, exceto, para o isolado BFT 26. Avaliando de forma isolada, os isolados BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3 diferiram da testemunha e de alguns

isolados nas plantas sem inoculação com os nematoides. Estes resultados foram confirmados nas plantas inoculadas.

Quanto à produção de massa seca da parte aérea, não obteve interação entre a testemunha, contudo, apresentou interação com o isolado BFT 26 e PD3. Nas plantas inoculadas com nematoides e infestadas com estes isolados, a produção de massa seca foi inferior aquelas sem inoculação. Nos tratamentos com inoculação, os isolados BFT 4 e AC 50 promoveram incrementos de 70,5%. Os isolados de actinobactérias AC 147 e BFT 41 apresentaram produção de massa seca das raízes inferior nas plantas inoculadas. Porém, o isolado BFT 4, promoveu incremento de 312,7% na massa seca das raízes de tomateiro das plantas inoculadas (Tabela 11).

**Tabela 11.** Altura das plantas, diâmetro do caule, massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) de mudas de tomateiro cultivadas em solo infestado com isolados de actinobactérias e inoculados ou não com nematoides.

Isolado	Altura (cm)		Diâmetro (mm)		MSPA (g)		MSR (g)	
	SI*	CI	SI	CI	SI	CI	SI	CI
Testemunha	49,00 Ab	41,25 Bc	5,30 Ab	4,81 Ab	3,08 Ac	2,48 Ac	0,84 Ad	0,55 Ac
AC 50	46,83 Ab	45,33 Ab	5,71 Ab	5,69 Aa	3,09 Ab	4,23 Aa	1,64 Ab	1,54 Ab
AC 92	57,33 Aa	54,00 Aa	5,28 Ab	5,33 Ab	3,20 Ac	3,57 Ab	1,13 Ac	1,86 Ab
AC 147	43,00 Ac	47,33 Ab	4,93 Ac	4,80 Ab	2,05 Ac	1,35 Ad	1,98 Ab	1,09 Bb
BFT 4	48,75 Ab	49,33 Ab	6,25 Aa	6,55 Aa	4,53 Aa	4,23 Aa	1,94 Ab	2,27 Aa
BFT 26	44,50 Ac	33,16 Bd	4,80 Ac	4,20 Bc	1,90 Ad	0,96 Bd	0,77 Ad	0,61 Ac
BFT 41	48,75 Ab	48,16 Ab	6,28 Aa	6,20 Aa	4,54 Aa	3,76 Aa	2,76 Aa	1,70 Bb
BFT 71	49,50 Ab	44,66 Ab	5,41 Ab	5,66 Aa	3,54 Ab	2,97 Ab	1,73 Ab	1,31 Ab
BFT 87	48,00 Ab	44,16 Ab	6,40 Aa	5,90 Aa	3,77 Ab	3,39 Ab	1,96 Ab	1,58 Ab
PD 3	49,33 Ab	43,66 Ab	6,38 Aa	6,16 Aa	5,04 Aa	4,08 Ba	2,25 Aa	1,64 Ab
CV(%)	13,92		9,11		22,28		43,24	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do período de incubação (aos 40 dias após incubação e após a coleta do experimento) para o mesmo isolado de actinobactéria e letras minúsculas na coluna comparam os isolados de actinobactérias entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Soares et al., (2010) avaliaram o efeito da infestação e incubação do solo com isolados de estreptomicetos no crescimento de mudas de tomateiro e verificaram que houve incremento de 266% e 300% na produção de massa seca da parte aérea e das raízes, respectivamente, em relação ao controle. Sousa et al., (2009), verificaram que a infestação e incubação do substrato por 20 dias, promoveram o crescimento e a melhoria nutricional das mudas de tomateiro. Tal período está associado ao ciclo de vida do actinomiceto e ao período necessário para a produção de enzimas extracelulares e degradação dos compostos presentes no substrato.

O efeito no crescimento das mudas também pode ter sido causado pela produção de substâncias promotoras de crescimento que podem ter promovido

tolerância a *M. javanica*. As bactérias promotoras de crescimento vegetal influenciam no crescimento vegetal por meio da indução de resistência a doenças, produção de substâncias como antibióticos, sideróforos, fitormônios, bem como por meio da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos, sendo estes mecanismos pelos quais são disponibilizados certos nutrientes as plantas (MARIANO et al., 2004; FREITAS, 2007). Outros mecanismos de biocontrole de fitopatógenos produzidos por várias bactérias promotoras de crescimento são os sideróforos, cianetos, enzimas desintoxicantes, antibióticos e enzimas líticas (BOTELHO et al., 2006).

A utilização de agentes biológicos constitui numa alternativa ecológica aos agroquímicos, além de ser uma estratégia significativa contra patógenos do solo para os quais as medidas de controle são restritas. Assim, os resultados destes trabalhos demonstraram que as actinobactérias tem grande potencial para o biocontrole de *M. javanica*.

## CONCLUSÕES

1. Os isolados de actinobactérias demonstraram ser produtores das enzimas extracelulares quitinase e lipase, sob condições *in vitro*;
2. Metabólitos secundários produzidos por 34 isolados de actinobactérias causaram taxa de mortalidade dos J2 de *M. javanica*, acima de 50% nos testes *in vitro*;
3. Os isolados de actinobactérias BFT 7, BFT 26, BFT 41, BFT 58, BFT 66, BFT 71, BFT 88, BFT 104, BFT 106 e PD3 reduziram o número de galhas nas raízes de mudas de tomateiro cultivadas no substrato Vivatto Slim®;
4. Os isolados PD3, BFT 26 e BFT 104 causaram elevada redução na massa de ovos de *M. javanica*, nas mudas de tomateiro cultivadas no substrato Vivatto Slim®;
5. Os isolados AC 92, BFT 4, BFT 41, BFT 87 e PD3 reduziram o número de galhas e de massa de ovos de *M. javanica*, nas raízes nas mudas de tomateiro cultivadas no solo;

6. A infestação e incubação do solo com os isolados de actinobactérias AC 50, BFT 4, BFT 41, BFT 71, BFT 87 e PD3 promoveram o crescimento das mudas de tomateiro cultivadas no solo inoculadas com *M. javanica*.

7. As actinobactérias apresentam potencial para o controle de *M. javanica* e promoção de crescimento do tomateiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M.M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, v.60, p.19-26, 2001.

ALVARENGA, M.A.R. **Tomate. Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras, MG: Perffil, 2004. 400 p.

ARDUIM, G. S. **Utilização e caracterização biológica de rizobactérias como biocontroladoras de *Meloidogyne incognita* e promotoras de crescimento em figueira**. 2006, 65p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, PR, 2006.

ARORA, N.K.; KIM, M.J.; MAHESHWARI, D. K. Role of chitinase and beta-1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 2, n.53, p.207-212, 2007.

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

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.J.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; PINTO, Z.V. Supressividade de fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.187-208, 2009.

BLACKBURN, K.; ALM, S.R.; YEH, T.S. Avermectin B1, izafox, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. **Journal of Nematology**, v.48, p.687-694, 1996.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações no método Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.533, 1981.

BOTELHO, G.R.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.; RUMJANEK, N.G. A importância de antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças de plantas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 31p., 2006 (Documentos n.211).

CARNEIRO, R.G.; FERRAZ, L.C.C.B.; MAZZAFERA, P. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.31, p.348-355, 1999.

CARNEIRO, R.G. **Efeitos de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica* sobre a absorção e translocação de nitrogênio, fósforo e cálcio e sobre a partição de carbono em cultivares de soja.**, 2000. 96p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2000.

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

CHARCHAR, J.M.; ARAGÃO, F.A.S. Variação anual da população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em cultivos de batata 'Bintje' no campo. **Nematologia Brasileira**, v.29, n.2, p.225-232, 2005.



COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Efeito antagônico de actinobactérias isolados de diferentes culturas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.231-234, 2004.

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

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito antagônico de actinobactérias isolados de ervas daninhas e gramíneas na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.10, n.2, p.144-153, 2010.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSTSCH. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1-10, 2009.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Toxicidade de filtrados a *M. incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.749-755, 2001.

DICKLOW, M.B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B.M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.159-173, 1993.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**, v.288, p.31-45, 2006.

EL- ABYAD, M. S.; EL-SAYED, M. A.; EL-SHANSHOURY, A. R. Towards the biological control of fungal and bacteria disease of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.149, p.185-195, 1993.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; SILVA, D.J.H.; BARBOSA, J.G.; PEDROSA, A.W. Cultivo sucessivo de plantas de tomate oriundas de sementes e propagação vegetativa em sistema hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.7, p.1013-1019, 2007.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000a, São Carlos, **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, p.255-258. 2000.

FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; DUTRA, M.R.; ROCHA, F.S.; SILVA, J.R.C.; POZZA, E.A.. Infectivity of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in tomato after starvation in soil and water at different conditions. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.270-274, 2007.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.1, p.61-70, 2003.

FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P.D.; FREITAS, S.S. (Eds.). **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**, Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, p.1-20, 2007.

GARABEDIAN, S.; VAN GUNDY, S.D. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. **Journal of Nematology**, v.15, p.503-510, 1983.

GOODAY, G.H., ZHU, W. Y., DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus. **FEMS: Microbiology. Let.** 100: 387-392. 1992.

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

HUTANGURA, P.; MATHESIUS, U.; JONES, M.G.K.; ROLFE B.G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Journal of Plant Physiology**, v.26, p.221-231, 1999.

JONATHAN, E.L.; BARKER, K.R.; ABDELALIM, F.F.; VRAIN, T.C.; DICKSON, D.W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v.30, n.2, p. 231-240, 2000.

KHAN, M.R.; KHAN, S.M.; MOHIDDIN, F.A.; ASKARY, T.H. Effect of certain phosphate-solubilizing bacteria on root-knot nematode disease of mungbean. **Development in Plant and Soil Sciences**, v.102, p.341-346, 2007.

KRECHEL, A.; FAUPEL, 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, p.772-786, 2002.

LIMA, J.L. **Seleção de actinobactérias para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

MANJULA, K.; GIRISH, A.G.; SINGH, S.D.; KISHORE, G.K. Combined Application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an Improved Biocontrol Activity Against Stem Rot in Groundnut. **Plant Pathology Journal**, v.20, n.1, p.75-80, 2004.

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

MELO, I. S. de, Rizobactérias Promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p. 87-110, 1998.

MILLER, P.M.; SANDS, D.C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.9, n.3, p.192-197, 1977.

MOURA, A. B. et al. Bioensaio para avaliação massal de actinobactérias antagonistas a *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.33, n.12, p.2065-2072. 1998.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.384-387, 2004.

NANÔ, S.S. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 2003, 47p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) -. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, 2003.

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

OTINIANO, A.J; FLORIAN, L.M.; SEVILLANO, R.B. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. **Idesia**, v.24, n.1, p.49-61, 2006.

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.327-343, 1998.

PAIXÃO, L.B.V.S. **Actinomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole do nematoide cavernícola da bananeira *Radopholus similis***. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2008.

PARK, J.O.; EL-TARABILY, K.A.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K. Pathogenesis of *Streptovercillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.361-365, 2002.

POLLAK, F.C.; BERGER, R.G. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, 1996.

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**, v.8, p.174-178, 1960.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S., Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40, p.524-532, 1991.

ROCHA, S.F. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** 2007, 148f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2007.

SIERRA, S.A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.23, n.1, p.15-22, 1957.

SILVA, H. S. A. **Seleção de actinobactérias antagonistas para o controle biológico da galha bacteriana da roseira incitada por *Agrobacterium tumefaciens***. 1998, 44f.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O.; ALMEIDA, N.S. Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.456-461, 2006.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; PEREZ, J.O. Production of streptomycete inoculums in sterilized rice. **Scientia Agricola**, v.64, n.6, p.241-244, 2007.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; GARRIDO, M.S.; LIMA, F.S. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, n.4, p.447-453, 2010.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. 2006, 65p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2006.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. da S.; ALMEIDA, G. M. Actinobactérias no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1759-1766, 2006.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F.S. Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em túberas de inhame. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.4, p.486-491, 2009.

STIRLING, G. R. 1991. **Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects**. Wallingford. Oxon, UK: CAB International.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Raleigh, North Carolina State University Graphics. 1978.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess 1969. 239 p.

YAN X; LIN M; LIU L. Screening of antagonistic streptomycete from soils against *Meloidogyne incognita*. **Chinese Journal of Biological Control**, v.20, p.202-205, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do tomateiro tem importante papel econômico e social no país, econômico pelo valor de produção e social pelos empregos diretos e indiretos que gera, e ainda pelo valor nutritivo. Contudo, doenças causadas por nematoides, principalmente aqueles do gênero *Meloidogyne*, possuem grande importância fitossanitária na cultura do tomateiro, pelos danos causados e pelas dificuldades no controle.

As actinobactérias são conhecidas mundialmente pela capacidade de produzir metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas extracelulares, que atuam na degradação de moléculas complexas, desempenhando importante papel nos processos de compostagem, bem como na promoção de crescimento e no controle de fitopatógenos.

A produção de enzimas extracelulares e ácido indolacético pelos isolados de actinobactérias *in vitro* (Capítulo 1) não é indicativo de que estas atividades fisiológicas ocorram *in vivo*. Neste trabalho, as atividades fisiológicas *in vitro* foram utilizadas apenas como indicadores de possíveis mecanismos de ação dos actinobactérias.

O efeito na promoção de crescimento pelas actinobactérias em mudas de tomateiro depende do isolado de actinobactéria (Capítulo 1).

As actinobactérias demonstraram ter potencial para o controle de *M. javanica*. Estes resultados foram verificados nos testes *in vitro* e em mudas de tomateiro, produzidas no substrato Vivatto Slim® e no solo (Capítulo 2), incubados e infestados com os actinobactérias, em condições de casa de vegetação.

Trabalhos futuros deverão ser conduzidos para identificação das actinobactérias ao nível de espécie e das substâncias envolvidas na interação actinomiceto-substrato-nematoide.

Trabalhos em campo deverão ser realizados, buscando o conhecimento aplicado, explorando o potencial destes isolados de actinobactérias. Estudos futuros com a utilização de isolados mais promissores, permitirão obter informação de extrema relevância para um controle eficiente de *M. javanica* e o crescimento de plantas de tomateiro e de outras culturas, contribuindo na estabilidade da produção e, conseqüentemente, garantindo o retorno dos investimentos feitos pelos produtores.