

Filtrados de Culturas Bacterianas Endofíticas na Motilidade, Mortalidade e Eclosão de Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyne javanica**

Rosemeire L. Naves¹, Vicente P. Campos² & Ricardo M. Souza²

¹Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Viticultura Tropical, Cx. Postal 241, CEP 15700-000, Jales, SP, fax: (17) 3632-9666, e-mail: rose@cnpuv.embrapa.br; ²Depto. Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG

(Aceito para publicação em 01/06/2004)

Autor para correspondência: Rosemeire de Lellis Naves

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 29:384-388. 2004.

RESUMO

Filtrados das culturas de 40 isolados de bactérias endofíticas, obtidos a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas foram testados na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne javanica*. As bactérias foram cultivadas em meio líquido "tryptic soy broth" por sete dias sob agitação constante a 28 °C, centrifugadas a 10.000 g por 15 min e o sobrenadante passado em filtro millipore de 0,22 µm de abertura. Cerca de 100 ovos ou 100 J₂ foram colocados em contato com cada filtrado bacteriano, para os ensaios de eclosão, motilidade e mortalidade. As avaliações foram feitas após 24 e 48 h para motilidade e mortalidade e após 15 dias para eclosão. Dos isolados testados, sete imobilizaram juvenis em

24 h, não ocorrendo recuperação da mobilidade após serem transferidos para água, provocando, dessa forma, porcentagens de mortalidade semelhantes à induzida pelo nematicida aldicarbe utilizado como controle. Os mesmos isolados também inibiram eficientemente a eclosão dos juvenis. Dois isolados provocaram a morte de mais de 90% dos juvenis após 48 h de exposição. Diferentes diluições dos filtrados dos oito isolados mais eficientes também foram testadas. Maiores índices de mortalidade e redução na eclosão foram provocados pelo filtrado não diluído e pelas diluições em água 1:1 e 1:2 (v/v).

Palavras-chave adicionais: metabólitos bacterianos, controle biológico, fitonematóides.

ABSTRACT

Filtrates of endophytic bacterium cultures on motility, mortality and hatching of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*

To obtaining the filtrates, bacteria were cultivated in liquid tryptic soy broth medium for seven days at 28 °C under constant stirring, centrifugated at 10,000 g for 15 min and the supernatant was filtrated by 0,22 µm Millipore. Nonmotile *Meloidogyne javanica* and dead ones were counted 24 and 48 h later and hatched J₂ were counted 15

days after setting up the experiment. Seven of 40 bacterial isolates tested immobilized the juveniles within 24 h, and they could not recover even in water. This effect was similar to the aldicarb treatment used as control. The filtrates of isolates also inhibited egg hatching. Two isolates killed more than 90% of J₂ after 48 h of exposure. Filtrate dilutions of the most efficient isolate in 1:1 and 1:2 (bacterial filtrate: water) also showed to have effective action on nematode behaviors.

INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias no controle biológico de fitonematóides tem recebido maiores atenções nas últimas décadas, sendo enfatizadas aquelas do gênero *Pasteuria* (Thorne) Sayre & Starr e as rizobactérias (Campos *et al.*, 1998). O modo de ação desses organismos sobre os nematóides tem sido discutido em alguns trabalhos (Jonhston, 1959; Sayre, 1980; Sikora & Hoffmann-Hergaten, 1996; Quadt-Hallmann *et al.*, 1996). Algumas bactérias, como as dos gêneros *Clostridium* Prazmowski, *Desulfovibrio* Kluyver & Van Niel, *Bacillus* Cohn, *Chromobacterium* Bergonzini, *Enterobacter* Hormaeche & Edwards e *Pseudomonas* Migula, já são comprovadamente capazes de produzir substâncias tóxicas aos nematóides (Jonhston, 1959; Lizuka *et al.*, 1962; Rodríguez-

Kábana *et al.*, 1965; Wilt & Smith, 1970; Ignoffo & Dropkin, 1977; Jacq & Fortuner, 1979). O efeito nematicida e nematos-tático de filtrados de culturas bacterianas foi inicialmente demonstrado por Lizuka *et al.* (1962) trabalhando com 134 isolados de bactérias do gênero *Pseudomonas*, dos quais 69 apresentaram intensa atividade nematicida contra *Meloidogyne* sp. Os mesmos autores demonstraram que filtrados de cultura de nove isolados de *Enterobacter* apresentaram alta atividade nematicida. Filtrados de cultura de *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, crescida em meio 'tryptic soy broth' (TSB), mostraram atividade nematicida a juvenis do segundo estágio (J₂) e ovos de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood (Oka *et al.*, 1993). Carneiro *et al.* (1998) testaram 21 isolados de *Bacillus* spp. em J₂ de *M. javanica* em ensaios *in vitro*. A cultura total e o sobrenadante de *Bacillus thuringiensis brasiliensis* Berliner e *B. lateosporus* Laubarch mataram juvenis recém eclodidos, após 24 e 48 h, enquanto *B. thuringiensis aizawai*

*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2000)

Heimpel, *B. thurigiensis morrisoni* Bonnefoi & Barjac e *B. circulans* Jordan causaram apenas imobilização ou redução de movimento. Apesar de pouca ênfase nas pesquisas, até o momento, as bactérias endofíticas têm merecido atenção, uma vez que esses organismos, devido à capacidade de viver no interior dos tecidos da planta, escapam da competição com outros microrganismos do solo (Misaghi & Donndelinger, 1990). Assim, podem se adaptar e sobreviver melhor nesse ambiente competitivo, beneficiando-se do catabolismo de metabólitos das plantas (McInroy & Kloepper, 1995). Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil sobre o antagonismo de bactérias endofíticas e nematóides.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar, *in vitro*, o efeito dos metabólitos produzidos por bactérias endofíticas, isoladas a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas, na motilidade, mortalidade e eclosão de J_2 de *M. javanica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de bactérias endofíticas

Foram amostradas no campo raízes de braquiária (*Brachiaria* sp. L.), crotalária (*Crotalaria* sp. L.), milho (*Zea mays* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), cravo de defunto (*Tagetes erecta* L.), tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) e trigo (*Triticum aestivum* L.). Bactérias endofíticas foram isoladas de raízes dessas plantas utilizando-se o método da trituração de tecidos desinfestados superficialmente, segundo Mariano *et al.* (1997) e Assis *et al.* (1998), com modificações. Para tanto, raízes sadias foram cuidadosamente lavadas em água de torneira e transferidas para frascos contendo solução tampão fosfato-potássio (PB) 0,02 M esterilizada, ajustando-se o pH para 7,0. Em seguida, foram submetidas à agitação vigorosa em equipamento do tipo orbital por 1 h, sendo essa operação repetida quatro vezes, após troca da solução PB. Procedeu-se a desinfestação superficial das raízes por passagem em álcool 50% por 30 s, hipoclorito de sódio 1% por 3 min, seguindo-se três lavagens por 1 min em solução PB. Com o objetivo de desalojar bactérias epifíticas remanescentes nos tecidos superficiais, as raízes foram transferidas para frascos contendo solução PB esterilizada e submetidas a um banho de ultra-som por 10 min. Nova desinfestação superficial das raízes foi feita com hipoclorito de sódio 1%, por 3 min, seguida de três lavagens em solução PB esterilizada. A seguir, as raízes foram novamente transferidas para frascos contendo solução PB esterilizada e submetidas a um novo banho de ultra-som por 10 min. A trituração das raízes foi feita em almofariz e pistilo esterilizados, contendo PB, e o triturado submetido a um banho de ultra-som por 10 min para desagregação das partículas e células bacterianas. Procedeu-se a homogeneização do triturado e posterior diluição em série em solução PB com fator de diluição 1:10. Retiraram-se, então, alíquotas de 100 µl das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , que foram transferidas para placas de Petri contendo meio “tryptic soy agar” (TSA) e espalhadas com alça de Drigalsky. Foram preparadas cinco placas para cada diluição, que foram mantidas

a 28 °C, durante 48 h, em câmara de crescimento. Para se verificar a eficiência da desinfestação superficial das raízes, após cada banho de ultra-som, como controle, alíquotas de 100 µl da solução de PB, utilizada para aquela operação, foram transferidas para placas de Petri contendo meio TSA e mantidas nas mesmas condições descritas para as placas preparadas com as diluições dos triturados. Não havendo crescimento bacteriano nessas placas dentro de 48 h, os isolados obtidos pela trituração das raízes foram considerados endofíticos. As colônias bacterianas apresentando características morfológicas diferentes dentro de uma mesma amostra, foram repicadas em meio TSA pelo método de estrias em T, visando à obtenção de colônias isoladas. Os isolados obtidos foram preservados em meio líquido peptona-glicerol em “freezer” a -80 °C.

Obtenção dos filtrados de culturas de bactérias endofíticas

Os isolados de bactérias foram transferidos para placas de Petri contendo meio TSA e incubadas a 28 °C em câmara de crescimento. Após 48 h, pequena porção da colônia bacteriana foi repicada para frascos de vidro contendo 100 ml de meio líquido “tryptic soy broth” (TSB), que permaneceram a 28 °C, por sete dias, em agitador orbital, sob agitação de 100 rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g, por 15 min, para remoção das células bacterianas e o sobrenadante passado em filtro Millipore com 0,22 µm de diâmetro de poro. Os filtrados obtidos foram utilizados nos ensaios de motilidade, mortalidade e eclosão J_2 de *M. javanica*.

Inóculo de *M. javanica*

A partir de uma população pura de *M. javanica* caracterizada conforme descrito por Taylor & Sasser (1978) e mantida em tomateiros suscetíveis (cv. Santa Clara) em condições de casa de vegetação, obteve-se uma suspensão de ovos utilizando-se a técnica de Hussey & Barker (1973). Os ovos obtidos foram submetidos à desinfestação superficial em câmara de fluxo laminar por meio de imersão em sulfato de estreptomicina 0,1% por 5 min (Carneiro *et al.*, 1998) e lavados por três vezes em água destilada e esterilizada, passando-se a suspensão através de peneiras com malha de 0,025 mm. A suspensão de ovos obtida foi mantida em câmara fria, a 8 °C, até o momento do estabelecimento dos ensaios.

Para obtenção dos J_2 utilizados nos ensaios de motilidade e mortalidade, preparou-se câmara de eclosão com tela e papel de espessura fina colocados em um béquer. Os J_2 obtidos foram submetidos à desinfestação superficial com sulfato de estreptomicina 0,1%, conforme descrito acima.

Três alíquotas de 1 ml foram retiradas das suspensões obtidas e colocadas em caixa plástica para quantificação de ovos ou J_2 ao microscópio estereoscópio.

Eclosão de juvenis de *M. javanica*

Em placas de Petri de 4 cm de diâmetro esterilizadas, foram colocados 5 ml de cada filtrado para onde foram transferidos cerca de 100 ovos. As placas foram mantidas em condições de laboratório a 25 ± 2 °C. Após 15 dias avaliou-se a porcentagem de J_2 eclodidos. Foram feitas cinco repetições

para cada tratamento, sendo utilizados como testemunhas água destilada esterilizada, meio TSB sem crescimento bacteriano e aldicarbe a 50 ppm. Foram instalados dois ensaios, utilizando-se 20 isolados em cada um, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram transformados em $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos a análise de variância. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5% de significância.

Motilidade e mortalidade J_2 de *M. javanica*

Em lâminas escavadas esterilizadas, foi colocado 0,6 ml de cada filtrado bacteriano, para onde foram transferidos cerca de 100 J_2 recém eclodidos. As lâminas foram transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e mantidas em condições de laboratório a 25 ± 2 °C. Cada tratamento foi repetido oito vezes e as testemunhas foram água destilada e esterilizada, meio TSB sem crescimento bacteriano e aldicarbe a 50 ppm. Após 24 e 48 h, avaliaram-se as porcentagens de J_2 aparentemente inativos, utilizando-se quatro repetições a cada período de avaliação. Foram considerados inativos os nematóides que apresentavam o corpo com aspecto retilíneo sob efeito de filtrados bacterianos ou retorcido, quando submetidos ao aldicarbe. Espécimens que permaneceram inativados 24 h após terem sido retirados do filtrado e transferidos para água foram considerados mortos. Foram instalados dois ensaios, sendo utilizados 20 isolados em cada um, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram transformados em $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos a análise de variância. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974) a 5% de significância.

Efeito de diluições dos filtrados bacterianos na motilidade, mortalidade e eclosão J_2 de *M. javanica*

Foram conduzidos ensaios com os oito isolados que se mostraram mais eficientes (MIL 1, MIL 4, MIL 5, MIL 7, MIL 16, MIL 21, BRA 5, BRA 15) na redução da motilidade e eclosão e aumento da mortalidade de J_2 de *M. javanica*. Para tanto, os filtrados das culturas bacterianas foram diluídos em água destilada esterilizada nas proporções de 1:0, 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v) (filtrado:água). Os ensaios foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado e em esquema fatorial 8 x 4, sendo oito isolados e quatro diluições. Cada tratamento foi repetido quatro vezes. Os dados obtidos foram transformados em $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois ensaios, alguns filtrados não causaram imobilidade ou mortalidade de J_2 , não diferindo, portanto, das testemunhas água e TSB, enquanto outros causaram imobilidade e mortalidade que não diferiram das causadas pelo aldicarbe. Entre esses dois extremos, alguns filtrados causaram diferentes graus de imobilidade e mortalidade aos J_2 (Tabelas

1 e 2), indicando que, provavelmente, diferentes substâncias tóxicas a *M. javanica*, em quantidades diversas, são produzidas pela maioria dos isolados endofíticos testados, podendo, assim, afetar a patogênese dos nematóides nos hospedeiros.

A imobilidade ou mortalidade de J_2 aumentou em todos os diferentes filtrados testados de 24 para 48 h, em certos casos em até 15 vezes como verificado no filtrado do isolado TRI 1 (Tabela 1), indicando, provavelmente, que o somatório dos efeitos de substâncias diferentes demanda tempo para sua expressão e, portanto, o período de avaliação de 48 h seria mais apropriado. Contudo, filtrados de alguns isolados, como o MIL 1, MIL 4, MIL 5, MIL 16, MIL 21, BRA 5 e BRA 15 (Tabelas 1 e 2), causaram altas porcentagens de imobilidade e mortalidade de J_2 já em 24 h, demonstrando, talvez, produzir grandes quantidades de substâncias tóxicas ou uma única ou mais substâncias com alta toxicidade capazes de imobilizar ou matar os J_2 rapidamente. O filtrado do isolado MIL 7 proporcionou aumento nas porcentagens de imobilidade e mortalidade de J_2 de 24 para 48 h, igualando-se àquelas porcentagens de imobilidade e mortalidade provocadas pelo aldicarbe quando em 48 h de exposição (Tabela 2).

TABELA 1 - Porcentagens médias de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne javanica* imóveis, mortos e eclodidos quando expostos aos filtrados das culturas dos isolados bacterianos endofíticos (primeiro ensaio *in vitro*)

Isolado*	% de J_2 móveis		% de J_2 mortos		% de J_2 eclodidos
	24 h**	48 h	24 h**	48 h	
TOM 1	2,50 f	4,75 e	2,00 h	4,75 e	89,60 b
CRO 1	0,25 g	4,50 e	0,25 i	4,50 e	95,20 c
TRI 1	4,25 d	66,50 b	3,75 h	66,50 b	95,00 c
TRI 2	0,00 g	1,50 e	0,00 i	1,50 e	89,40 b
MIL 1	90,50 b	98,50 a	90,50 b	98,50 a	10,40 a
MIL 2	4,50 f	11,25 d	3,75 h	11,25 d	93,20 c
MIL 3	3,25 f	4,75 e	3,00 h	4,75 e	94,20 c
MIL 4	93,25 b	96,25 a	93,25 b	96,25 a	14,20 a
MIL 5	91,50 b	95,75 a	91,50 b	95,75 a	9,20 a
MIL 6	1,00 g	5,75 e	1,00 i	5,75 e	91,00 b
MIL 9	33,75 f	4,25 e	2,75 h	4,25 e	91,00 b
MIL 10	54,25 c	78,50 b	54,25 d	74,10 b	93,00 c
MIL 11	36,50 d	76,25 b	36,50 e	76,25 b	92,80 c
MIL 12	7,00 e	10,00 d	7,00 g	9,25 d	90,80 b
MIL 14	2,25 f	5,00 e	2,25 h	5,00 e	93,20 b
MIL 16	90,00 b	96,25 a	75,00 c	96,25 a	12,20 a
MIL 17	5,25 f	10,25 d	5,25 g	10,25 d	82,20 b
MIL 19	52,00 e	72,00 b	52,00 e	70,00 b	88,80 b
MIL 20	12,00 c	39,00 c	12,00 f	39,00 c	91,40 b
MIL 21	85,25 b	95,00 a	85,25 c	95,00 a	8,80 a
ÁGUA	0,00 g	0,00 e	0,00 i	0,00 e	96,60 c
TSB	0,50 g	2,75 e	0,00 i	2,75 e	96,20 c
ALDICARBE (50 ppm)	99,50 a	100,00 a	99,50 a	100,00 a	4,60 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

*Isolado obtido de raízes de TOM: tomateiro; MIL: milho; CRO: crotalaria; TRI: trigo. TSB: Meio líquido "tryptic soy broth"

**Tempo de exposição

TABELA 2 - Porcentagens médias de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne javanica* imóveis, mortos e eclodidos quando expostos aos filtrados das culturas dos isolados bacterianos endofíticos (segundo ensaio *in vitro*)

Isolado*	% de J_2 imóveis		% de J_2 mortos		% de J_2 eclodidos
	24 h**	48 h	24 h**	48 h	
BRA 2	32,25 e	56,75 c	32,25 b	56,75 c	90,40 c
BRA 4	11,75 f	29,75 d	11,75 c	29,75 d	91,80 c
BRA 5	85,25 c	98,25 a	85,25 a	98,25 a	9,00 a
BRA 6	5,25 g	24,00 e	4,25 c	24,00 e	87,20 c
BRA 8	2,75 g	13,50 e	2,75 c	13,50 e	85,80 c
BRA 9	2,25 g	27,00 d	2,25 c	27,00 d	89,20 c
BRA 10	3,00 g	16,75 e	3,00 c	16,75 e	91,80 c
BRA 11	2,50 g	58,50 c	2,75 c	58,50 c	76,80 c
BRA 12	4,00 g	18,25 e	4,00 c	18,25 e	89,40 c
BRA 13	13,75 f	64,25 c	12,00 c	56,75 c	90,40 c
BRA 14	2,25 g	37,75 d	2,25 c	37,75 d	90,80 c
BRA 15	94,50 b	98,25 a	94,50 a	98,75 a	20,00 b
BRA 17	12,00 f	64,75 c	12,00 c	64,75 c	89,00 c
BRA 18	34,50 e	60,50 c	34,50 b	60,50 c	91,40 c
BRA 19	55,00 d	93,50 b	55,00 b	93,50 b	89,60 c
BRA 20	67,25 d	98,75 a	67,25 b	98,75 a	88,00 c
MIL 7	64,25 d	99,25 a	64,25 b	99,25 a	12,00 a
MIL 8	43,25 e	60,00 c	43,25 b	60,00 c	28,40 b
MIL 13	41,25 e	66,75 c	41,25 b	66,75 c	92,80 c
MIL 15	13,25 d	39,50 d	10,75 c	39,50 d	84,40 c
ÁGUA	0,00 h	0,25 f	0,00 c	0,25 f	95,00 c
TSB	0,50 h	2,25 f	0,00 c	2,25 f	94,20 c
ALDICARBE (50 ppm)	99,25 a	100,00 a	99,25 a	100,00 a	3,20 a

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

*Isolado obtido de raízes de MIL: milho; BRA: braquiária. TSB: Meio líquido "tryptic soy broth"

**Tempo de exposição

Dos dez filtrados que causaram mais de 90% de mortalidade e imobilidade em J_2 , apenas sete não reduziram eclosão ao nível da provocada pelo aldicarbe (Tabelas 1 e 2), demonstrando que a redução na eclosão deve ser provocada, neste caso, pelas mesmas substâncias que causaram a mortalidade e imobilidade. Oka *et al.* (1993) verificaram que filtrados de cultura de *B. cereus* crescida em meio TSB, mostraram atividade nematicida a ovos de *M. javanica*. Contudo, nos filtrados dos isolados BRA 19 e BRA 20, não houve redução na eclosão quando comparada com a testemunha (Tabela 2), demonstrando que nesses filtrados as substâncias que afetaram a motilidade e causaram a morte de J_2 não foram as mesmas capazes de reduzir a eclosão.

Embora todos os isolados testados tenham apresentado comportamentos médios semelhantes ($P \leq 0,05$), as diluições dos filtrados de culturas bacterianas endofíticas provocaram reduções sucessivas e significantes na imobilidade e mortalidade (Figura 1), bem como aumentos significantes na eclosão de J_2 de *M. javanica* (Figura 2), demonstrando existência de substância tóxica no filtrado que, diluída, perde gradualmente atividade. Em média, a primeira diluição diminuiu em 10,26%

imobilidade e mortalidade e aumentou em 2,3 vezes eclosão. Na segunda diluição (1:2 v/v) a redução média da imobilização e da mortalidade foi de 35,52% e o aumento de eclosão três vezes. Já na terceira diluição (1:3 v/v) a redução na imobilização e mortalidade foi muito maior que aqueles valores das diluições 1:1 e 1:2 (Figura 1), indicando a capacidade do J_2 em se desintoxicar quando a concentração do princípio tóxico absorvido é baixa, alterando, talvez, a natureza da molécula nos centros oxidativos do pseudoceloma.

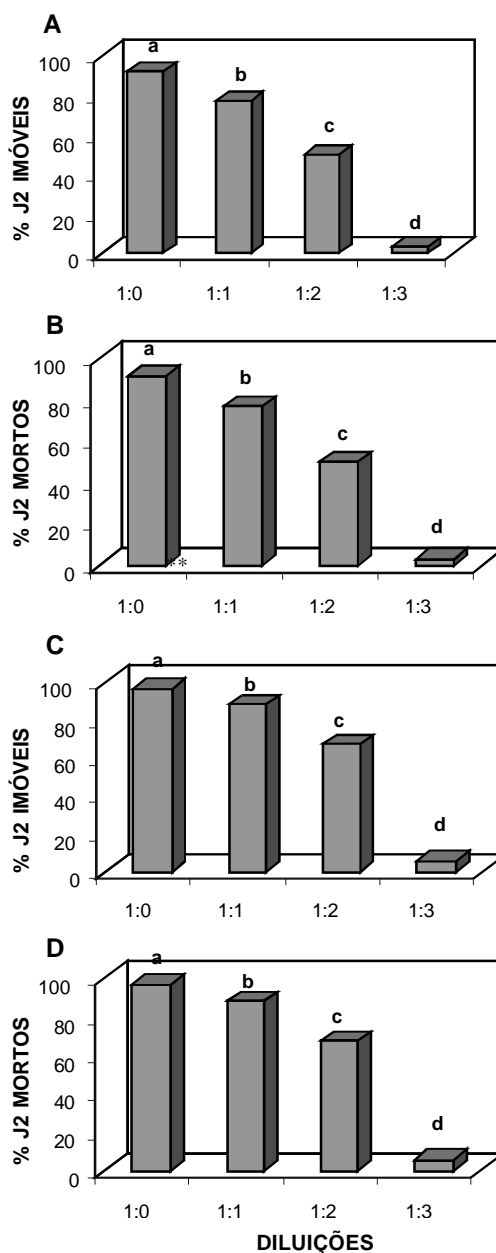


FIG. 1 - Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne javanica* imóveis e mortos após 24 e 48 h de exposição às diferentes diluições dos filtrados de culturas de oito isolados de bactérias endofíticas. A) J_2 imóveis após 24 horas; B) J_2 mortos após 24 h; C) J_2 imóveis após 48 h; D) J_2 mortos após 48 h. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

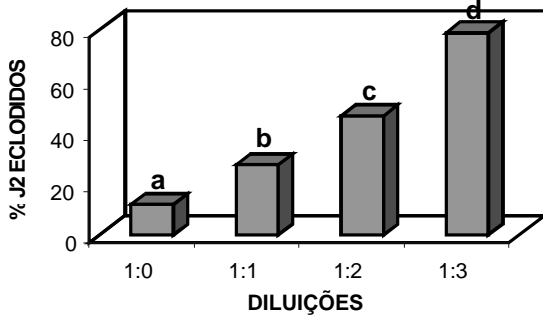


FIG. 2 - Porcentagens médias de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* eclodidos após 15 dias de exposição às diferentes diluições de filtrados de culturas de bactérias endofíticas. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Essa hipótese, contudo, ainda necessita comprovação (Lee & Atkinson, 1977). Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos com nematicidas em baixas concentrações (Huang *et al.*, 1983; Gordon *et al.*, 1996).

Embora tenha ocorrido aumento na diluição 1:3, as porcentagens de eclosão não aproximaram aos 95% esperados, havendo, assim, efeito inibitório significativo dos filtrados mesmo em baixas concentrações (Figura 2). Dessa forma, o referido processo de desintoxicação não foi tão eficaz no embrião quanto no J_2 .

Não houve interação entre os fatores isolados bacterianos e diluições, sendo que todos os isolados estudados comportaram-se de forma semelhante na redução da imobilidade e mortalidade e no aumento da eclosão, demonstrando, provavelmente, que esses isolados produzem quantidades semelhantes das substâncias tóxicas a J_2 no meio líquido.

A colonização interna das raízes pelos isolados MIL 1, MIL 4, MIL 5, MIL 7, MIL 16, MIL 21, BRA 5 e BRA 15 pode, talvez, levar à proteção das mesmas contra o ataque de *M. javanica* pelo efeito tóxico direto no patógeno. Outros isolados, entretanto, podem ter outros modos de ação, induzindo mecanismos de resistência do hospedeiro a esses nematóides, o que ainda precisa ser investigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S.M.P., SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R. & MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagonístico no controle da podridão negra em repolho. *Summa Phytopathologica* 24:216-220. 1998.

CAMPOS, V.P., SOUZA, J.T. & SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 6:285-327. 1998.

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

GORDON, R., CHIPPET, J. & TILLEY, J. Effects of two carbamates on infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* all strain and

Steinernema feltiae Umeå strain. *Journal of Nematology* 28:310-317. 1996.

HUANG, S.P., RESENDE, I.C., SOUZA, P.E. & CAMPOS, V.P. Effect of aldicarb, ethoprop, and carbofuran on control of coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. *Journal of Nematology* 15:510-514. 1983.

HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028. 1973.

IGNOFFO, C.M. & DROPKIN, V.H. Deleterious effect of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil inhabiting, myceliophagous, and plant parasitic nematodes. *Journal of Kansas Entomological Society* 50:394-398. 1977.

IIZUKA, H., KOMAGATA, T., KUNII, Y. & SHIBUYA, M. Nematicidal action of microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry* 26:199. 1962. (Abstract)

JACQ, V.A. & FORTUNER, R. Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. *Revue de Nématologie* 2:41-50. 1979.

JOHNSTON, T.M. Effect of fatty acids mixtures on the rice stilet nematode (*Tylenchorhynchus martini* Fielding, 1956). *Nature* 183:1392. 1959.

LEE, D.L. & ATKINSON, H.J. *Physiology of nematodes*. 2nd ed. New York: Columbia University Press, 1977.

MARIANO, R.L.R., ASSIS, S.M.P., MELLO, M.R.F., MOURA, F.F., ANDRADE, A.Q.V. & SILVA, G. Método de isolamento de bactérias endofíticas. *Fitopatologia Brasileira* 22:235. 1997. (Resumo)

McINROY, J.A. & KLOPPER, J.W. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173:337-342. 1995.

MISAGHI, I. J. & DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80:808-811. 1990.

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

QUADT-HALLMANN, A., HALLMANN, J., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. & KLOPPER, J.W. Nematode interactions with endophytes II: effect of nematode density on colonization of endophytic bacteria. *Anais, III International Nematology Congress, Gosier, Guadeloupe Antilles, French West Indies, 1996*. pp.135-136.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., JORDAN, J.W. & HOLLIS, J.P. Nematodes biological control in rice fields: role of hydrogen sulfide. *Science* 148:524. 1965.

SAYRE, R.M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *Journal of Nematology* 12:260-270. 1980.

SCOTT, A.J. & KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30: 507-512. 1974.

SIKORA, A. & HOFFMANN-HERGARTEN, S. Nematode interactions with plant health promoting rhizobacteria. *Anais, III International Nematology Congress, Gosier, Guadeloupe Antilles, French West Indies, 1996*. pp.72-73.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina: International *Meloidogyne* Project. 1978.

WILT, G.R. & SMITH, R.E. Studies on the interactions of aquatic bacteria and aquatic nematodes. *Water Resources Research Institute Bulletin* 1:701. 1970.(Abstract)