

Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp.

Rafael H. Fernandes¹, Everaldo A. Lopes¹, Bruno S. Vieira² & Amanda F. Bontempo¹

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de isolados de *Bacillus* spp. no controle de *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação. Os isolados 25, 35, 49, 51 e a mistura destes foram aplicados na superfície do solo, de vasos plásticos de 2 L contendo solo:areia (1:1; v:v) (2L/ha, 1×10^9 ufc/mL) infestado com 5.000 ovos de *M. javanica* e comparados com a testemunha não tratada e ao meio de cultura MSF. Decorridos 60 dias após o semeio do feijoeiro procedeu-se a avaliação da massa da parte aérea e das raízes das plantas, além dos números de galhas e de ovos do nematoide por sistema radicular. O delineamento experimental adotado foi do tipo inteiramente casualizado, com cinco repetições. A aplicação dos isolados bacterianos não aumentou significativamente a massa das raízes de feijoeiros parasitados com *M. javanica*. Nenhum isolado bacteriano reduziu o número de galhas induzidas pelo nematoide. O isolado 51 reduziu a produção de ovos do nematoide em níveis aproximadamente quatro vezes inferiores aos observados em plantas testemunhas.

Palavras chave: Controle biológico, nematoide das galhas, *Phaseolus vulgaris*.

Control of *Meloidogyne javanica* on common beans with *Bacillus* spp. isolates

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus* spp. on the control of *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions. The isolates 25, 35, 49, 51 and their mixture (2L/ha, 1×10^9 cfu / mL) were applied on the surface of potted soil (plastic pots with 2L of soil:sand, 1:1, v:v) infested with 5000 eggs of *M. javanica* and compared with the untreated control and the MSF broth. Sixty days after sowing common bean, the biomass of aboveground parts and root system, besides the numbers of gall sand eggs per root system of the nematode were evaluated. The experimental design was of a completely randomized design with five replicates. The application of the bacterial isolates did not significantly increase the biomass of the roots *M. javanica*-infested plants. None bacterial isolate reduced the number of galls of the nematode. However, the isolate 51 reduced the number of eggs of the nematode at levels approximately four times lower than those observed in control plants.

Key words: Biological control, root-knot nematode, *Phaseolus vulgaris*.

¹Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, Rodovia BR-354 km 310 C. Postal 22, 38810-000 Rio Paranaíba (MG) Brasil. E-mail: rafael.fernandes@ufv.br

²Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo, 38500-000, Monte Carmelo (MG) Brasil

INTRODUÇÃO

Os nematoides são um dos principais problemas fitossanitários da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na região do Alto Paranaíba – Minas Gerais, principalmente nos municípios de Patos de Minas e Lagoa Formosa. Esses patógenos se encontram disseminados na região e o seu aumento populacional é favorecido pelo cultivo contínuo de culturas hospedeiras (feijão, soja, milho), temperaturas moderadas a altas e disponibilidade de água durante praticamente todo o ano, suprida por chuvas ou via irrigação. O desconhecimento por parte dos produtores da presença do patógeno nas áreas de cultivo é um fator adicional que agrava a sua disseminação e multiplicação (Ferraz *et al.*, 2010).

O controle de nematoides é uma prática cara e difícil. O princípio da exclusão é o mais importante quando se pensa no controle do patógeno, ou seja, o agricultor deve evitar o estabelecimento deste organismo em um local onde ele não ocorra. A partir do momento que a área foi infestada, a erradicação do patógeno torna-se praticamente impossível e as medidas de controle que serão adotadas visarão apenas à redução na população dos nematoides no solo (Ferraz *et al.*, 2001).

A utilização de rotação do feijoeiro com culturas que apresentem algum nível de resistência a tais nematoides seria uma ferramenta de manejo benéfica; contudo, a escassez de materiais com que conciliam resistência e boas características agronômicas limita seu uso. No caso do feijoeiro, a maioria dos cultivares é suscetível aos nematoides (Silva & Del Peloso, 2006).

O uso de adubação verde e rotação com plantas que inibem a reprodução dos nematoides é uma medida recomendada. Dentre essas plantas, citam-se leucena, crotalária, mucuna, amendoim, guandu, etc. O plantio de *Tagetes erecta* L., *Crotalaria spectabilis* Roth e *Cajanus cajan* L. para *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949 (Godfrey) e *Pratylenchus brachyurus* Filipjev & Schuurmans Stekhoven ou *Tagetes patula* L. e *Crotalaria paulina* Schrank, se a espécie dominante for *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, pode diminuir o nível

populacional desses nematoides no solo (Silva & Del Peloso, 2006; Machado *et al.*, 2007). Todavia, embora seja desejável, a utilização dessas plantas no sistema agrícola é normalmente dificultada por fatores econômicos, em razão da tendência à monocultura (Ferraz *et al.*, 2001).

Considerando o manejo químico do patógeno com nematicidas, nenhum produto está registrado no MAPA para a aplicação na cultura do feijoeiro (MAPA, 2012). Com isso, ainda que tais produtos representem limitações quanto à segurança ambiental e riscos à saúde humana e animal, nem mesmo esta possibilidade de manejo de nematoides está disponível para utilização pelos produtores de feijão. Desta forma, novas estratégias que visem reduzir a população de espécies de *Meloidogyne* (Goeldi, 1887) e *Pratylenchus* (Filipjev, 1936) devem ser pesquisadas e as informações ou produtos resultantes desses estudos, a exemplo dos bionematicidas, necessitam estar à disposição dos agricultores.

Vários pesquisadores relataram a ação nematicida de espécies do gênero *Bacillus* no controle de diferentes fitonematoides (Carneiro *et al.*, 1998; Jonathan *et al.*, 2000; Kempster *et al.*, 2001; Chen & Dickson, 2004), como, por exemplo, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus laterosporus* Laubach 1916, *Bacillus circulans* Jordan 1890, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, *Bacillus pumilis*, *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, *Bacillus sphaericus* Neide e *Bacillus licheniformis* Shaler.

Neste contexto objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de isolados de *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* em feijoeiros cultivados em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi em casa de vegetação localizada na Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil.

O inóculo de *M. javanica* foi produzido em raízes de tomateiros “Santa Clara” cultivados em casa de vegetação. O substrato empregado para plantio foi composto pela mistura de solo e areia (1:1, v:v), previamente autoclavada a 120°C por 1

hora. A partir das raízes de tomateiros exibindo galhas e massas de ovos, cerca de 60 dias após a inoculação, foi preparada uma suspensão contendo ovos para a infestação do solo em parcelas experimentais, extraídos conforme descrito por Hussey & Barker (1973) e modificado por Boneti & Ferraz (1981).

A suspensão resultante foi recolhida em béquero com capacidade de 250 mL e usada para as inoculações dos ovos no experimento. A concentração do inóculo foi ajustada com o auxílio da câmara de Peters (Southey, 1970).

Os isolados bacterianos utilizados foram aqueles que apresentaram melhor desempenho em um outro trabalho, no qual foi avaliada a capacidade dos isolados em inibir a eclosão de juvenis de *M. javanica* 'in vitro'. Os isolados foram cultivados em frascos tipo erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura MSF (Meio Sementes Farroupilha: 2,5g NaCl; 2g KH₂PO₄; 2,5g K₂HPO₄; 0,25g MgSO₄.7H₂O; 0,1g MnSO₄.H₂O; 5 g dextrose e 4 g extrato de levedura em 1000 mL de água) e incubados a temperatura ambiente (25°C) em agitador orbital por 48 h sob agitação constante (250 rotações por minuto), no escuro. Após o período decorrido, o meio de cultura foi centrifugado por 15 min, a 2000 g, para a separação das células bacterianas. A suspensão bacteriana foi ajustada para 10⁹ células/mL e mantida à 4 °C até a sua utilização.

Para a montagem do experimento vasos de plástico de 2 L de capacidade foram preenchidos com uma mistura solo:areia (1:1). O solo de cada vaso foi infestado com 5.000 ovos do nematoide e revolvido, visando à homogeneização do inóculo do patógeno. Em seguida, as suspensões bacterianas ou o meio de cultura MSF foram aplicados ao solo com auxílio de pulverizador costal pressurizado por CO₂ a 30 lpf/pol², munido de barra com dois bicos tipo leque 11002, distanciados 0,5 m entre si, com volume de calda de 200L/ha e com dose da suspensão ajustada para 2 L/ha. Posteriormente, aplicou-se 142 mL de água esterilizada na superfície do solo de cada vaso, simulando chuva ou

lâmina de irrigação equivalente a 5 mm. O objetivo desta operação foi permitir a percolação das células bacterianas no perfil do solo e aumentar o contato direto com os ovos do patógeno, sem que haja perda do inóculo bacteriano.

Aos dois dias após a infestação do solo, três sementes de feijoeiro cultivar Pérola foram semeadas em cada vaso. Após a abertura completa da folha primária foi realizado o raleio das plântulas, deixando-se apenas uma por vaso.

O experimento foi composto por oito tratamentos, incluindo solo infestado com *M. javanica* e tratado com suspensão bacteriana contendo um dos quatro isolados; solo infestado com nematoides e tratado com a mistura dos quatro isolados; solo infestado e tratado apenas com o meio de cultura MSF; além de parcelas não tratadas com as bactérias e com solo infestado ou não com nematoides.

Os experimentos foram conduzidos por 60 dias após o semeio do feijoeiro, com a avaliação da massa da parte aérea e das raízes das plantas, além dos números de galhas e de ovos do nematoide por sistema radicular.

O delineamento experimental adotado nos experimentos foi do tipo inteiramente casualizado, com cinco repetições. A parcela experimental foi constituída por uma planta mantida em vaso. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação dos isolados bacterianos não afetou significativamente a biomassa de raízes de feijoeiros parasitados por *M. javanica* (Tabela 1), quando comparados com a testemunha. Comparativamente com plantas não inoculadas com o nematoide, a massa das raízes de plantas cultivadas em solo tratado com os isolado 35 foi significativamente menor.

Nenhum isolado de *Bacillus* reduziu o número de galhas de *M. javanica*, por outro lado, o isolado 51 reduziu a produção de ovos de *M. javanica* em níveis aproximadamente

quatro vezes inferiores aos observadas nas plantas testemunhas (Tabela 1).

Tabela 1. Massa das raízes de feijoeiros, número de galhas e de ovos de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular após a aplicação ao solo de suspensões de isolados de *Bacillus* spp. ou meio de cultura MSF, após 60 dias de cultivo das plantas em casa de vegetação.

Tratamentos	Massa das raízes (g)	Número de galhas*	Número de ovos*
Isolado 35	7,02 b	167 b	24.920 ab
Isolado 51	10,51 ab	160 b	7.140 b
Isolado 26	8,74 ab	195 b	16.940 ab
Isolado 49	14,09 ab	369 ab	28.280 ab
Mistura de isolados	23,07 a	503 a	15.680 ab
Meio de cultura MSF	18,29 ab	343 ab	28.980 ab
Testemunha infestada	11,16 ab	422 ab	27.720 a
Testemunha não infestada	27,73 a	-	-
CV (%)	64,58	9,39	7,90

Média de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. *Dados transformados para $\text{Log}_{10}(X)$ para atendimento das pressuposições da análise de variância.

Resultados semelhantes foram relatados por Vaz *et al.* (2011) ao pesquisarem o efeito da microbiolização de sementes de tomateiro com um isolado de *B. subtilis* sobre *M. incognita* e *M. javanica*. Na ocasião, os autores não observaram diferença significativa na massa de raízes, massa de parte aérea, formação de galhas e número de ovos em relação ao tratamento testemunha. Contudo no presente trabalho somente isolado 51 reduziu o número de ovos produzidos pelo nematoide.

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Araújo & Marchesi (2009) relataram incrementos na altura e biomassa da parte aérea e das raízes de tomateiros tratados com *B. subtilis*. Tais diferenças ocorrem, principalmente, pela capacidade intrínseca de cada isolado em promover crescimento de plantas e atuar no controle de nematoides em função de diversos mecanismos (Maciel & Ferraz, 1996).

A aplicação de *Bacillus* spp. pode causar o incremento tanto de parte aérea quanto no sistema radicular de algumas culturas, todavia esta característica pode estar aliada com a redução populacional dos fitonematoides ou não. O acréscimo de matéria seca na parte aérea de plantas tratadas com *Bacillus* caracteriza a bactéria como promotora de crescimento de planta, e esse efeito pode ser devido, em parte, à produção de fitoreguladores vegetais por *B. subtilis* na rizosfera (Araújo *et al.*, 2005).

A aplicação de isolados de *B. subtilis* proporcionou um incremento da parte aérea em plantas de cana-de-açúcar mesmo que a população de fitonematoides tenha aumentado ao longo do cultivo da cana. Sendo que diferentes variedades de cana apresentam diferentes resposta a aplicação de tratamentos biológicos (Mazzuchelli e Araújo, 2011). Permitindo inferir que o mecanismo de ação antagonico da bactéria para com o nematoide

pode variar inclusive com a variedade da cultura apresentando eficiência de controle variável.

Considerando a dificuldade do manejo destes nematoides a adoção de várias táticas de controle combinadas podem apresentar melhores resultados. Esta ideia aplica-se também à combinação de micro-organismos usados no controle biológico associados matéria orgânica, sendo esta uma tática que pode aumentar potencial de controle de nematoides (Cannayane & Rajendran, 2001). Sendo esta uma alternativa para posteriores estudos envolvendo os isolados testados neste trabalho.

A associação de *B. cereus*, *Pochonia chlamidosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) e Fibra de coco reduziram em mais de 35% o número de galhas e em mais de 50% o número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro (Dalle-Mole-Giaretta et al, 2010). Assim como o isolado 51 reduziu em cerca de quatro vezes o número de ovos *M. javanica*.

Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho isolados de *B. cereus*, testados por Freitas et al, (2005) para o controle de *M. javanica* reduziram o número de galhas em cerca de 55%, quando aplicado via microbiolização de sementes de tomate. Em relação à técnica de aplicação da bactéria, o tratamento de sementes com suspensão bacteriana (microbiolização) para o controle de tem sido utilizada com o preceito de que durante o processo de germinação das sementes são liberados exsudatos radiculares que são utilizadas pelo microorganismo como fonte nutricional, auxiliando-o no estabelecimento no sistema, proporcionando vantagem seletiva na colonização e sobrevivência bacteriana nas raízes (Subrahmanyam et al., 1983; Kloepper 1985). Assim, a forma com que o antagonista é aplicado no solo pode interferir na capacidade de controle do nematoide.

Durante a decomposição da matéria orgânica no solo os copostos que são liberados podem ser nocivos ao nematoide em algum estágio do seu ciclo de vida, aliado a isto a própria matéria orgânica pode servir como substrato para o crescimento e

estabelecimento dos antagonistas no solo (Rodriguez-Kábana & Morgan-Jones, 1987; Cannayane & Rajendran 2001).

B. subtilis, em uma formulação com resíduos orgânicos, usado na inoculação de sementes de soja, algodão e milho proporcionou ganhos no crescimento e nutrição das plantas, aumentando também a emergência das plântulas e incrementando a matéria seca nas plantas de milho. Mostrando assim que a utilização deste organismo pode ser uma alternativa viável para a inoculação de sementes (Araújo, 2007).

CONCLUSÕES

Não houve diminuição da formação de galhas e ovos nas raízes, bem como os isolados não incrementam a massa da parte aérea e de raízes das plantas, inclusive, no tratamento com o isolado 35 a massa de raízes foi significativamente menor em relação a testemunha. Apenas o isolado 51 reduz a produção de ovos de *M. javanica*, sendo que a produção de ovos nas plantas testemunhas foi cerca de quatro vezes maior do que nas plantas tratadas com este isolado. Assim, os isolados de *Bacillus* spp. testados não se mostraram eficazes como potenciais biocontroladores de *M. javanica* em plantas de feijoeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo apoio financeiro, ao Laboratório Farroupilha e ao UNIPAM, ambos localizados em Patos de Minas (MG), por auxiliarem no desenvolvimento dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA. 2005. M.Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645.
- ARAÚJO, F.F. 2007. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência Agrotécnica, Lavras**. v.32, p.456-462.
- ARAÚJO, F.F. & MARCHESI, G.V.P. 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção de crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, 39(5): 1558-1561.

- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6: 553.
- CANNAYANE, I. & G. RAJENDRAN. 2001. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). **Current Nematology**, 12 (1, 2): p.51-55
- CARNEIRO, R.G.; SOUZA, I. & BELARMINO, L.C. 1998. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 22: p.12-21.
- CHEN, S. & DICKINSON, D.W. 2004. Biological control of nematodes with bacterial antagonists. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKINSON, D.W (Eds). *Nematology – Advances and Perspectives*, v.2: Nematode Management and Utilization. **Tsinghua University Press & CABI Publishing**, p. 1041-1082.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; ZOOCA, R.J.F.; PODESTÁ, G.S.; CAIXETA, L.B.; FERRAZ, S. & LOPES, E.A.. 2010. Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, 34: p.18-22.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA. **Manejo sustentável de fitonematóides**. Viçosa, MG: UFV, 2010. 304p.
- FERRAZ, S.; DIAS, C.R. & FREITAS, L.G. 2001. Controle de nematoides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (ed). *Manejo Integrado-Fitossanidade: Cultivo protegido, pivô central e plantio direto*. Viçosa: **Editora UFV**, pp. 1-52.
- FREITAS, L.G.; W.S. NEVES, C.F.S.; FABRY, B.M.; MARRA, M.M.; COUTINHO, R.S.; ROMEIRO & S. FERRAZ. 2005. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, 29 (2) p.215-220
- JONATHAN, E.I.; BARKER, K.R.; ABDELALIM, F.F.; VRAIN, T.C. & DICKSON, D.W. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, 30(2): 231-240.
- KEMPSTER, V.N.; DAVIES, K.A. & SCOTT, E.S. 2001. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). **Nematology**, 3: 35-43.
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LABIBERTÉ, M. & ZALESKA, I. 1985. Measuring the spermosphere colonizing capacity of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, 31: p.926 - 929.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparasion of methods on collectinh inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report* (57)12:1025-1028
- MACHADO, A.C.Z.; MOTTA, L.C.C.; SIQUEIRA, K.M.S.; FERRAZ, L.C.C.B. & INOMOTO, M.M. 2007. Host status of green manures for two isolates of *Pratylenchus brachyurus* in Brazil. **Nematology**, 9: 799-805.
- MACIEL, S.L. & FERRAZ, L.C.C.B. 1996. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, 53: 956-960.
- MAPA. 2012. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Março de 2012. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 26. mar. 2012
- MAZZUCHELLI, R.C.L. & ARAÚJO, F.F. 2011. Eficácia do controle de nematóides por *Bacillus subtilis* em duas variedades de cana-de-açúcar. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Presidente Prudente. **Colloquium Agrariae**, vol. 7. 51-58.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R. & G. MORGAN-JONES. 1987. Biological control of nematodes: soil amendments and microbial antagonists. **Plant and Soil**. 100: 237-247.
- SILVA, C.C. & DEL PELOSO, M.J. 2006. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na Região Central-brasileira 2005-2007. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 139 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, 193).
- SOUTHEY, J. F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 5th ed. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London: Her Majesty Stationery Office, 148 p.
- SUBRAHMANYAN, P., M.N. REDDY & A.S. RAO. 1983. Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. **Seed Science and Technology**, 11: 267-272.
- VAZ, M.V.; CANEDO, E. J.; VIEIRA, B.S. & LOPES, E.A. 2011. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, 8: 203-212