

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**LAURA OLIVEIRA DIMAN**

**PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus* NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE  
*Meloidogyne***

**Uberlândia – MG  
Junho - 2007**

**LAURA OLIVEIRA DIMAN**

**PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus* NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE  
*Meloidogyne***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Maria Amelia dos Santos

**Uberlândia – MG  
Junho – 2007**

**LAURA OLIVEIRA DIMAN**

**PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus* NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE  
*Meloidogyne***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

**Aprovado pela Banca Examinadora em 25 de junho de 2007.**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Amelia dos Santos  
Orientadora

---

Prof. Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira  
Membro da Banca

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pelas oportunidades que me foram apresentadas.

À minha orientadora, professora Maria Amelia dos Santos, pelos ensinamentos, pela paciência, confiança, competência, dedicação e por ter sido um exemplo de profissionalismo e de vida.

Aos meus pais pelas oportunidades que me conceberam, pelo amor, companheirismo, paciência, dedicação e força que deram para as minhas escolhas e conclusão do curso. Agradeç-lhes por sempre estarem presentes em minha vida.

Aos meus irmãos, que de alguma forma contribuíram para meu bom desempenho durante estes anos, em especial ao Sandro, amigo de profissão que sempre foi um pai para mim e ao Mateus que é minha fonte de inspiração.

Ao meu namorado Alex pela paciência, compreensão, amor, carinho, companheirismo e dedicação desde o início.

Às minhas eternas amigas, Ana Lúcia, Carla, Ingrid, Josy e Lara, pelos momentos maravilhosos que vivemos juntas, por todo o aprendizado e por terem me estendido à mão sempre que precisei e à Morgana, companheira fiel de muitos anos.

Aos amigos Cleber e Aires Ney pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os fitonematóides causam perdas consideráveis na produção agrícola, resultando em prejuízos ao produtor e elevação dos preços ao consumidor. Neste contexto, insere-se a adoção do controle biológico que traz grandes vantagens como a redução do uso de defensivos químicos, a melhoria na renda dos agricultores e a não contaminação do meio ambiente. Entre as rizobactérias, destacam-se as do gênero *Bacillus* que são muito promissoras no controle de fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a aplicação de produtos biológicos à base de *Bacillus* no controle dos fitonematóides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Uberlândia. Foram testados os tratamentos: produto japonês à base de *Bacillus* nas doses de 2 e 4 kg.ha<sup>-1</sup>; produto Nemix composto por *Bacillus* sp, lactose 97,8% e dióxido de silício nas doses de 2 e 4 kg.ha<sup>-1</sup>; Água (controle) e; produto aldicarbe (Temik 150G) na dose de 15 kg.ha<sup>-1</sup>, com cinco repetições. Pelos resultados obtidos, verificou-se que para *M. incognita* os tratamentos não tiveram efeito sobre a movimentação e eclosão dos nematóides. Para *M. javanica* todos os tratamentos foram igualmente eficazes ao produto químico, no que diz respeito à inibição da movimentação. Quanto à inibição da eclosão, nenhum dos tratamentos apresentou efeito. Para *M. exigua*, o produto japonês nas doses de 2 e 4 kg.ha<sup>-1</sup> e o Nemix na dose de 2 kg.ha<sup>-1</sup> apresentaram maior efeito quanto à inibição da movimentação do juvenil, porém inferior ao padrão de eficácia, o nematicida aldicarbe. Em relação à inibição da eclosão, nenhum dos tratamentos diferiu do controle, ou seja, não apresentaram eficácia. Para *M. paranaensis*, Nemix na dose de 4 kg.ha<sup>-1</sup> teve a mesma eficácia que o produto químico na inibição da movimentação da movimentação e em relação à inibição da eclosão os melhores resultados foram apresentados com as duas doses de Nemix, porém eficácia inferior ao padrão Temik.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Rizobactérias.....	8
2.1.1 PGPR como agentes de biocontrole.....	8
2.1.2 Efeito das rizobactérias sobre os fitonematóides.....	9
2.1.3 O ambiente rizosférico.....	10
2.1.4 Vantagens das rizobactérias para aplicação comercial.....	10
2.2 Gênero <i>Bacillus</i> .....	11
2.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
2.3 Gênero <i>Meloidogyne</i> .....	12
2.3.1 <i>Meloidogyne incognita</i> .....	13
2.3.2 <i>Meloidogyne javanica</i> .....	13
2.3.3 <i>Meloidogyne exigua</i> .....	13
2.3.4 <i>Meloidogyne paranaensis</i> .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Ensaio de avaliação dos produtos na atividade do nematóide.....	15
3.1.1 Obtenção de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne</i> .....	15
3.1.2 Instalação e avaliação do ensaio <i>in vitro</i> .....	16
3.2 Ensaio de avaliação da inibição na eclosão de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne</i> .....	17
3.2.1 Instalação e avaliação do ensaio <i>in vitro</i> .....	17
3.3 Delineamento e análise estatística.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

## 1 INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas causam perdas significativas para o produtor. Sasser e Freckman (1987) estimaram perdas de 100 bilhões de dólares por ano em termos mundiais.

A utilização de cultivares resistentes a nematóides nem sempre é possível por falta de fontes de resistência para o melhoramento genético, pela falta de adaptabilidade dos cultivares resistentes a determinadas regiões ou épocas de plantio, ou pela quebra de resistência em condições de campo. A rotação de culturas é inviável para algumas espécies, como *Meloidogyne* spp., por possuírem ampla gama de hospedeiros. O controle químico de nematóides geralmente não é recomendado por não ser muito efetivo, caro e pelos resíduos que deixa nos alimentos e contaminação do ambiente. Devido a estas desvantagens, existem pressões por parte da sociedade para que o uso de químicos seja cada vez mais restrito e uma demanda, por parte dos agricultores, por produtos que sejam, ao mesmo tempo, atóxicos ao homem e animais, baratos e bastante efetivos no controle de nematóides fitoparasitas (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Neste contexto atual, de uma sociedade moderna e ecológica que se preocupa com a preservação do meio ambiente, insere-se o controle biológico como opção aos métodos tradicionais de controle. Segundo Almeida (2001), o controle biológico consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos às lavouras. Trata-se de uma estratégia muito utilizada em sistemas agroecológicos, assim como na agricultura convencional que se vale do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Para Almeida (2001), embora o controle biológico traga respostas positivas na redução ou abandono do uso de agrotóxicos e na melhoria de renda dos agricultores, a análise do conjunto de experiências realizadas mundialmente mostra que os resultados ainda estão concentrados em apenas alguns cultivos. Ainda existe muito que desenvolver em controle biológico de pragas e doenças na agricultura.

No Brasil, em 1990, surgiu um campo de pesquisa em controle biológico que tratava do uso de bactérias colonizadoras de raízes de plantas, denominadas rizobactérias (KLOEPPER et al., 1990). As rizobactérias benéficas por promoverem o crescimento das plantas e/ou atuarem no controle biológico de fitopatógenos são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR, “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria”) (KLOEPPER; SCHROTH, 1981 *apud* FREITAS, 2002). As PGPR favorecem uma maior disponibilidade de nutrientes às plantas e podem produzir combinações e concentrações de

substâncias promotoras de crescimento. Entretanto, o maior efeito destas rizobactérias é o de suprimir patógenos e rizobactérias deletérias ao crescimento de plantas. A inibição destas bactérias deletérias se dá através da produção de sideróforos, substâncias que agem sob condições de pouca disponibilidade de fósforo por reduzir ainda mais o fósforo disponível para outros microrganismos da rizosfera ou pela produção de antibióticos (SCHIPPERS et al., 1987).

Este trabalho teve com objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito de produtos biológicos à base de bactéria *Bacillus* no controle de fitonematóides, a saber: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis*.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Rizobactérias**

Os solos abrigam uma complexa comunidade biológica, da qual microrganismos, procariotas e eucariotas, constituem maioria, tanto em número quanto em diversidade. Alguns procariotas têm como nicho ecológico a rizosfera, e, ou, o rizoplano de plantas, onde se multiplicam, sobrevivem e se protegem da ação antagonística do restante da microflora do solo. Esses organismos têm sido genericamente denominados rizobactérias (LIU et al., 1995;).

Em associação com as plantas, as rizobactérias podem ter efeito deletério, nulo ou benéfico. Aquelas que exercem efeito benéfico - promoção de crescimento e controle biológico de enfermidades - são chamadas PGPR (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas), correspondente à sigla em inglês ("Plant Growth-Promoting Rhizobacteria"). Estima-se que apenas 0,6% das rizobactérias possuem algum efeito benéfico para a planta com a qual encontram-se associadas (KLOEPPER, 1996).

#### **2.1.1 PGPR como agentes de biocontrole**

PGPR têm sido usadas para o controle biológico de doenças de plantas e assim aumentar a produtividade de culturas. Como e porque esse controle biológico é exercido, ainda é um tema que carece de mais estudos (FREITAS, 2002).

Em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico por antagonismo direto exercido pela PGPR contra o fitopatógeno, com envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose: produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos (ROMEIRO, 1999).

Pesquisas têm mostrado que certas PGPR parecem atuar como eliciadoras de ISR (resistência sistêmica induzida), no sentido em que a planta fica sistemicamente protegida contra mais de um patógeno, ao contrário do controle biológico clássico, que visa e implementa o controle de forma mais específica (WEI et al., 1991).

Quando a PGPR coloniza o sistema radicular, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas (VAN LOON et al., 1998) atuam como eliciadores de um sinal bioquímico. Esse sinal transloca-se até sítios distantes do local de sua origem. Genes que codificam para a síntese de componentes da resistência dinâmica são desativados e expressa-se a resistência sistêmica induzida (ROSS, 1961).

Algumas rizobactérias produzem metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematóides *in vitro*, enquanto outras inibem a eclosão de juvenis e o processo pelo qual penetram às raízes (STIRLING, 1991).

### **2.1.2 Efeito das rizobactérias sobre os fitonematóides**

O controle que as rizobactérias exercem sobre os fitonematóides pode ser executado de várias formas. Diversas fases do ciclo deste patógeno são impedidas e assim ele não o completa. Freitas (2002) sugere como pode ocorrer este controle e em quais fases do ciclo:

- Ovo: antibióticos e toxinas produzidos pelas bactérias da rizosfera difundem-se pelo solo e podem ser absorvidos pelos ovos dos nematóides, matar suas células e impedir o desenvolvimento embrionário e formação do juvenil.

- Eclosão: rizobactérias degradam os exsudatos radiculares que funcionam como fator de eclosão para muitas espécies de nematóides. E também existe a possibilidade de que compostos absorvidos pelo ovo inativem o nematóide ou causem deformações durante seu desenvolvimento que o impeçam de sair do ovo.

- Direcionamento e mobilidade: o nematóide apresenta movimento aleatório no solo até detectar, por meio de seus órgãos sensoriais, baixas concentrações de exsudatos radiculares de seu hospedeiro. Isto o direciona e estimula sua locomoção em direção à maior concentração destes exsudatos até que ele encontre a raiz. A transformação do exsudato radicular em subprodutos pelo metabolismo de rizobactérias pode fazer com que o nematóide simplesmente não reconheça o estímulo quimiotrópico, assim ele continuaria a se movimentar aleatoriamente até esgotar suas reservas de energia e morrer sem penetrar a raiz. Caso o nematóide reconheça os exsudatos radiculares e se direcione para as raízes, alguns produtos bacterianos podem apresentar características nematostáticas e reduzir a mobilidade do nematóide a ponto de impedir que ele atinja a raiz.

- Reconhecimento do hospedeiro: ao encontrar a raiz, o nematóide projeta seu estilete na epiderme radicular e prova o conteúdo das células das raízes. Substâncias produzidas pelas rizobactérias são absorvidas pelas raízes e podem alterar sua composição química, fazendo com que os nematóides não reconheçam seu hospedeiro. Acredita-se também que as rizobactérias se ligam à lectinas na superfície das raízes, caracterizadas por serem o sítio de ligação entre o nematóide e a planta hospedeira, impedindo que ele a reconheça.

- Penetração na raiz: substâncias tóxicas ou repelentes produzidas pelas rizobactérias, em alta concentração na região do rizoplane ou no conteúdo celular da epiderme das raízes,

podem desestimular a penetração dos nematóides na planta hospedeira, ou mesmo a alimentação destes.

- Alimentação: as rizobactérias, ou seus produtos metabólicos, podem ser absorvidos pela planta e esta ao perceber a presença do nematóide, desencadeia uma reação de hipersensibilidade nas células gigantes, que é o principal mecanismo de resistência varietal a nematóides do gênero *Meloidogyne*. Esta resistência é denominada de resistência sistêmica por não ser intrínseca a planta, ou seja, é uma reação que está sendo induzida nela através da presença da rizobactéria.

- Reprodução: algumas rizobactérias têm maior efeito na redução de ovos do que na redução do número de galhas, este pode ser um dos mecanismos atuantes.

### **2.1.3 O ambiente rizosférico**

As bactérias não estão distribuídas aleatoriamente na rizosfera, mas sim agregadas, principalmente nas regiões intercelulares da epiderme por serem áreas de ativa exsudação (BOWEN; FOSTER, 1978).

Um dos métodos mais convenientes de introduzir uma rizobactéria no ambiente da raiz é através da aplicação desta nas sementes antes da semeadura. O processo de germinação de sementes libera carboidratos e aminoácidos em abundância na forma de exsudatos de sementes (LYNCH, 1978). Desta forma, estes organismos introduzidos com as sementes no solo utilizam os exsudatos como fonte nutricional e colonizam as raízes assim que elas emergem. De acordo com Kloepper et al. (1985), os isolados de rizobactérias que possuem maior habilidade de utilizar exsudatos de sementes possuem vantagem seletiva na colonização de raízes.

Rizobactérias do gênero *Bacillus* também estão freqüentemente associadas ao controle de nematóides, mas outros gêneros também mostram-se promissores. Sikora (1988) observou reduções de infecção de *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* e *Rotylenchulus reniformis* em torno de 60 a 65% com o tratamento de sementes de várias culturas com um isolado de *Bacillus subtilis*. Racke e Sikora (1992) comprovaram que as rizobactérias são eficientes em condições de campo, quando inoculadas juntas ou isoladamente.

### **2.1.4 Vantagens das rizobactérias para aplicação comercial**

As rizobactérias têm uma série de vantagens sobre os nematicidas ou mesmo sobre outros agentes de controle biológico: são fáceis de serem produzidas em massa; são de fácil armazenamento; são adaptáveis à tecnologia de formulação e não requerem manipulação genética (SIKORA; HOFFMANN-HERGATEN, 1992).

As rizobactérias podem ser aplicadas via tratamento de substrato, imersão de sistemas radiculares de mudas em suspensões bacterianas, rega da planta com suspensão bacteriana, por imersão das sementes em suspensão de rizobactérias ou pela peletização das rizobactérias com as sementes em alginato (OOSTENDORP; SIKORA, 1989).

## 2.2 Gênero *Bacillus*

De acordo com Pelczar (1996), as espécies de *Bacillus* são Gram-positivas e caracterizam-se por possuírem parede celular espessa e pela ausência de membrana externa, o que as difere das bactérias Gram-negativas. Grande parte da parede das bactérias Gram-positivas é formada por peptideoglicano.

Os bacilos Gram-positivos têm grande importância, pois são caracterizados na microbiologia médica, infectam humanos e animais e exercem o controle de insetos dentre outras atuações. Entre muitas espécies, o *B. anthracis* causa carbúnculo. Esta é uma doença que infecta animais e também humanos através do contato com seus esporos. Resulta em edema e congestão e em alguns casos pode desencadear em mediastinite hemorrágica, pneumonia, meningite e sepsis. Nos animais eles disseminam-se rapidamente atingindo a corrente sanguínea podendo levar a morte. O *B. cereus* provoca uma doença que, se manifesta mais como intoxicação alimentar, associada a carnes e temperos. Esta intoxicação tem duas formas distintas: a emética e a diarréica (JAWETZ et al., 1998). A espécie *B. thuringiensis*, comporta-se como patogênica para insetos e possuem em suas células cristais na forma de toxina protéica (toxina Bt) que matam certas larvas de insetos. Estes ao ingerirem a bactéria, os cristais de toxina dissolvem-se e destroem o revestimento do trato intestinal dos insetos (PELCZAR et al., 1996).

As espécies Gram-positivas são divididas em grupos conforme suas características morfológicas e bioquímicas. O gênero *Bacillus* é pertencente ao grupo das Bactérias Esporuladas (PELCZAR et al., 1996). São espécies formadoras de esporos que são estruturas resistentes a alterações ambientais, suportam calor seco e certos desinfetantes químicos por períodos moderados de tempo. Eles persistem durante anos em terra seca. São microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação como é o

caso de *B. cereus e subtilis* (JAWETZ et al., 1998), devido ao complexo enzimático produzido pelas células. Em geral, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. São células em forma de bastonetes, às vezes em cadeia e, é devido a esta característica que são denominadas bacilos. Apesar da grande variação entre as diferentes espécies desse gênero, várias características, como a formação de esporos, toxinas e enzimas, levaram os patógenos pertencentes a esse gênero a um lugar privilegiado entre os agentes altamente promissores no controle de fitopatógenos (BACILLUS, 2006).

Uma das principais espécies de *Bacillus* relacionada ao controle de doenças em plantas é *B. subtilis*.

### **2.2.1 *Bacillus subtilis***

O efeito benéfico de *B. subtilis*, quando aplicado junto às sementes ou ao solo, não é exclusivamente devido ao antagonismo proporcionado aos patógenos. A bactéria influencia positivamente a germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas pela solubilização de fósforo (LUZ, 2001).

Somando-se às vantagens, *B. subtilis* apresenta um efeito benéfico sobre a nodulação de leguminosas conforme observado por Araújo (1994), o que o torna especialmente importante como agente de controle biológico nestas culturas.

### **2.3 Gênero *Meloidogyne***

Segundo Gomes e Campos (2003), os nematóides do gênero *Meloidogyne* apresentam grande diversidade de hospedeiros alternativos e ocorrem nas mais variadas regiões do globo, causando prejuízos em diferentes culturas. O principal sintoma é a presença de galhas nas raízes das plantas. Estas galhas são malformações ou engrossamentos do sistema radicular. As plantas afetadas apresentam-se enfraquecidas, com baixa produção, desfolhamento precoce e declínio prematuro, podendo ocorrer, ocasionalmente, a morte da planta, sendo os sintomas potencializados sob condições de estresses nutricionais e de seca.

Inicialmente, juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne* penetram nas raízes e estabelecem um sítio de alimentação na região do cilindro central da raiz. Com o desenvolvimento do nematóide, os J<sub>2</sub> diferenciam-se em adultos machos ou fêmeas. Os machos, adultos, abandonam o sistema radicular e, as fêmeas permanecem no interior das

raízes, alimentando-se como endoparasitas sedentárias, até o final do seu ciclo. Durante o desenvolvimento da fêmea de *Meloidogyne* são colocados, aproximadamente, 500 ovos. Estes são depositados em uma matriz gelatinosa externa às raízes, dos quais eclodem os J<sub>2</sub>, que reinfestam o sistema radicular. O ciclo de vida do nematóide das galhas é de aproximadamente quatro semanas, podendo prolongar-se sob condições de temperatura menos favoráveis. Temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 35°C e condições de seca ou de encharcamento do solo diminuem o desenvolvimento e a sobrevivência do nematóide (GOMES; CAMPOS, 2003).

### **2.3.1 *Meloidogyne incognita***

Para o controle químico de áreas infestadas com *M. incognita*, pode-se aplicar produtos que contenham como ingrediente ativo carbofurano, fenamifós ou metam-sódico, entre outros, de acordo com a cultura em questão. Além dos produtos químicos, pode-se realizar a rotação de culturas com plantas não hospedeiras, como o trigo, sorgo, amendoim ou adotar a prática de cobertura do solo (adubação verde) com plantas que não sejam hospedeiras como a aveia preta, crotalária ou mucuna (SISTEMA... , 2007).

### **2.3.2 *Meloidogyne javanica***

O controle de *M. javanica* pode ser feito com o uso de alguns produtos químicos que detenham certos ingredientes ativos como carbofurano, etoprofós, aldicarbe, metam-sódico ou fenamifós, entre outros, tendo em vista a cultura em questão. A prática da rotação de culturas também é importante no controle devido à implantação de culturas não hospedeiras como amendoim, abacaxi, arroz ou utilizar espécies vegetais como cobertura do solo que também não sejam hospedeiras como a aveia-preta (SISTEMA... , 2007).

### **2.3.3 *Meloidogyne exigua***

Este nematóide é muito agressivo e é muito disseminado nos cafezais. Dentre as alternativas de controle químico em áreas infestadas por *M. exigua*, pode-se utilizar produtos químicos que contenham algum dos ingredientes ativos terbufós e carbofurano, de acordo com a cultura de que se trata. Dentre as culturas comerciais não hospedeiras, destacam-se o algodão, amendoim, arroz e aveia-preta (SISTEMA... , 2007).

#### **2.3.4 *Meloidogyne paranaensis***

Assim como o *M. exigua*, o *M. paranaensis* é muito disseminado na cultura do café, não sendo muito problema em outras culturas. Quanto ao seu controle, Santiago et al. (2006) obtiveram resultados positivos com o fungo *Paecilomyces lilacinus*, e este reduziu a população do nematóide nas raízes de tomateiro cv. “Santa Clara” em casa de vegetação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2006, no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram estudadas quatro espécies de fitonematóides do gênero *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis* e dois produtos biológicos em duas doses diferentes: produto japonês à base de *Bacillus* e o produto Nemix composto por *Bacillus* sp, lactose 97,8% e dióxido de silício. O nematicida usado como padrão de eficácia foi Temik 150G (aldicarbe), cujas características são:

- Marca Comercial: Temik 150
- Registrante: Bayer CropScience Ltda.
- Classe(s): Acaricida - Inseticida - Nematicida
- Formulação: GR – Granulado
- Ingrediente Ativo (i.a.): aldicarbe
- Concentração de i.a.: 150 g/kg
- Modo de Aplicação: Terrestre
- Modalidade de Emprego: Solo
- Classificação Toxicológica: I - Extremamente tóxico

O experimento constou de seis tratamentos:

- Água: testemunha absoluta;
- P1D2: produto japonês na dose de 2 kg.ha<sup>-1</sup>;
- P1D4: produto japonês na dose de 4 kg.ha<sup>-1</sup>;
- Produto Nemix na dose de 2 kg.ha<sup>-1</sup>;
- Produto Nemix na dose de 4 kg.ha<sup>-1</sup>;
- Nematicida aldicarbe (Temik 150G) na dose de 15 kg.ha<sup>-1</sup>

#### 3.1 Ensaio de avaliação dos produtos na atividade do nematóide

##### 3.1.1 Obtenção de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne*

Raízes de cafeeiro e tomateiro contaminadas pelas espécies de *Meloidogyne* foram lavadas para a retirada do excesso de solo aderido a elas, cortadas e processadas pela técnica do liquidificador (BONETI; FERRAZ, 1981).

As raízes cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento foram colocadas no copo do liquidificador, preenchendo com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo, até encobrir o material. O liquidificador foi ligado em sua menor rotação por 40 segundos em média. Em seguida a suspensão obtida foi passada pela peneira de 100 mesh sobreposta a de 500 mesh. O resíduo foi recolhido da peneira de 500 mesh com auxílio de jatos de água de uma pisseta para um copo de Bequer, com cuidado para que o volume final fosse o mais concentrado possível.

As suspensões que ficaram mais turvas foram processadas pela centrífuga para separação de ovos das impurezas. Foram centrifugados por 5 min a uma velocidade de 650 gravidades. Cuidadosamente, o sobrenadante foi eliminado e a parede interna do tubo de centrífuga, limpa para a retirada de impurezas orgânicas. Em seguida foi adicionada ao resíduo de cada tubo, solução de sacarose na concentração de 454g de açúcar para 1 L de água, misturou-se bem e a centrífuga foi ligada à mesma velocidade anterior durante 1 min.

O sobrenadante foi vertido na peneira de 500 mesh, lavado com água para retirar o excesso de sacarose e recolhido com auxílio de jatos de água de uma pisseta em um copo de bequer.

Placas de Petri com diâmetro de 5 cm receberam em seu interior uma tela de nylon contendo camada de lenço facial de papel. A suspensão de ovos foi adicionada sobre a camada de lenço de papel e as placas de Petri foram colocadas em estufa incubadora à 30°C por 24 horas.

Após 24 h, a tela com o lenço de papel foi suspensa pelo auxílio de uma pinça e o líquido no interior da placa de Petri foi removido para um Bequer e a placa lavada com água. A tela com papel foi recolocada na placa e água foi adicionada. As placas permaneceram na incubadora por 48 h.

Depois de 48 h, as telas foram retiradas e o líquido recolhido com auxílio de jatos de água de uma pisseta para um copo de Bequer. A suspensão foi calibrada para conter 250, 50, 100 e 20 juvenis de 2º estágio/mL de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis* para montagem do teste *in vitro*, respectivamente.

### **3.1.2 Instalação e avaliação do ensaio *in vitro***

Placas de Petri com diâmetro de 11 cm contendo uma camada de ágar-água a 2%, receberam 1 mL da suspensão de juvenis de 2º estágio e 1 mL de cada tratamento a ser testado: água destilada; solução de Temik 150G (nematicida); solução do produto japonês à base de *Bacillus* nas duas dosagens; solução do produto Nemix nas duas dosagens. Com movimento giratório, foram bem misturados os 2 mL. As placas ficaram em incubadora à 30°C por 7 dias.

Após 7 dias, cada placa foi examinada sob lupa para verificação e contagem de nematóides ativos.

### **3.2 Ensaio de avaliação da inibição na eclosão de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne***

Raízes de cafeeiro e tomateiro foram processadas pela técnica do liquidificador (BONETI; FERRAZ, 1981) já descrita anteriormente no item 3.1.1.

As suspensões foram calibradas para conter 1500 ovos/mL, 100 ovos/mL, 500 ovos/mL e 200 ovos/mL de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis*, respectivamente.

#### **3.2.1 Instalação e avaliação do ensaio *in vitro***

Placas de Petri com diâmetro de 5 cm, contendo no seu interior, tela de nylon com uma camada de lenço de papel umedecido, receberam 1 mL de cada tratamento a ser testado e 1 mL da suspensão de ovos. As placas foram mantidas em incubadora à 30°C por 7 dias.

Após 7 dias, as telas foram retiradas e o líquido de cada placa foi recolhido, usando jatos de água de uma piseta, para um copo.

Cada suspensão foi examinada sob microscópio, com auxílio de uma câmara de contagem, para verificação e contagem de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne*.

### **3.3 Delineamento e Análise estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com 6 tratamentos e 5 repetições para cada nematóide. Cada placa de Petri foi a unidade experimental.

Os dados obtidos foram submetidos aos procedimentos da estatística do programa Sisvar (FERREIRA, 2000). Na análise estatística, os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na avaliação do efeito dos produtos no controle dos nematóides, foram calculadas porcentagem de inibição de movimentação e porcentagem de inibição da eclosão de juvenis.

A fórmula utilizada no cálculo destas porcentagens foi a seguinte:

$\frac{(B-A)}{B} \times 100$ , onde:

B

A = número de nematóides ativos ou eclodidos em cada repetição de cada tratamento.

B = número de nematóides utilizados no ensaio para avaliação da inibição de movimentação ou da inibição de eclosão.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados apresentados na Tabela 1 verifica-se que para *Meloidogyne incognita* os tratamentos com produtos biológicos não diferiram significativamente entre si. Não tiveram efeito satisfatório em relação à inibição na movimentação do nematóide, pois pode-se observar resultados equivalentes ao da água e diferentes significativamente do produto Temik, considerado como referência na inibição de movimentação do nematóide. O mesmo pode-se observar em relação à inibição da eclosão dos juvenis, pois tanto os produtos biológicos quanto a testemunha absoluta não diferiram significativamente.

Pelos dados apresentados na Figura 1A e 2A verifica-se que apenas o nematicida Temik diferiu significativamente dos demais tratamentos apresentando o melhor resultado em relação a porcentagem de mortalidade e de inibição de eclosão de juvenis de *M. incognita*.

Para *Meloidogyne javanica* não houve diferença significativa entre os produtos testados e o Temik, mostrando que estes produtos tiveram efeito satisfatório sobre a inibição na movimentação do nematóide (Tabela 1). Em relação à inibição de eclosão dos juvenis, observa-se que os tratamentos não diferiram da testemunha absoluta e o nematicida Temik obteve o maior efeito quanto à inibição.

De acordo com a Figura 1B nenhum dos tratamentos diferiram significativamente entre si, com exceção da água que apresentou o pior resultado quanto a porcentagem de mortalidade. Através da Figura 2B observa-se que o Temik apresentou o melhor resultado sendo que os demais tratamentos apresentaram o mesmo efeito quanto a porcentagem de inibição de eclosão de juvenis de *M. javanica*.

Pelos dados da avaliação apresentados na Tabela 1 verifica-se que para *Meloidogyne exigua* o produto biológico japonês nas duas doses e o Nemix na dose de 2 kg ha<sup>-1</sup> tiveram o mesmo efeito quanto à inibição na movimentação do nematóide, seguidos pelo Nemix na dose de 4 kg ha<sup>-1</sup>. Todos apresentaram efeito superior a testemunha absoluta, e o nematicida mostrou-se superior a todos os demais tratamentos. Com relação à inibição da eclosão de juvenis, todos os tratamentos incluindo a testemunha absoluta e o nematicida, foram significativamente iguais. Isto mostra que tanto os produtos testados quanto o nematicida não apresentaram efeito sobre a inibição de eclosão, assim como o controle. Este resultado pode ser explicado pelo fato de o nematicida não ser registrado para o controle desta espécie de *Meloidogyne*.

Quanto a porcentagem de mortalidade de *M. exigua*, o nematicida apresentou maior eficácia. Em seguida, o produto japonês nas doses de 2 e 4 kg ha<sup>-1</sup> e o Nemix na dose de 2 kg

ha<sup>-1</sup> não apresentaram resultados significativos, sendo superiores a Nemix na dose de 4 kg ha<sup>-1</sup> e a Água, que apresentou o pior resultado (Figura 1C). Quanto a porcentagem de eclosão nenhum dos tratamentos diferiu entre si (Figura 2C).

Para *Meloidogyne paranaensis*, o Nemix na dose de 4 kg ha<sup>-1</sup> apresentou resultado significativamente igual ao nematicida (Tabela 1). Em seqüência, estão os produtos japonês nas doses de 2 e 4 kg ha<sup>-1</sup> e o Nemix na dose de 2 kg ha<sup>-1</sup>, sendo que todos os produtos biológicos tiveram efeito maior que a testemunha absoluta. Em relação à inibição da eclosão dos juvenis, o produto Nemix com as duas doses tiveram o mesmo efeito apresentando os melhores resultados entre os produtos testados, seguidos pelo produto biológico japonês nas duas doses. Todos os produtos testados diferiram da testemunha absoluta e o nematicida teve efeito superior a todos os demais tratamentos.

O produto Temik e o Nemix na dose de 4 kg ha<sup>-1</sup> foram os mais eficazes e não diferiram significativamente entre si em relação a porcentagem de mortalidade de *M. paranensis*. Em seguida, os produtos japonês na dose de 2 e 4 kg ha<sup>-1</sup> e o Nemix na dose de 2 kg ha<sup>-1</sup> apresentaram os mesmos resultados sendo estes superiores a Água (Figura 1D). Quanto a porcentagem de inibição de eclosão, Temik diferiu significativamente de todos os outros tratamentos, sendo superior a estes. Em seqüência está o produto Nemix nas doses de 2 e 4 kg ha<sup>-1</sup>. Este apresentou-se mais eficaz que o produto japonês nas doses de 2 e 4 kg ha<sup>-1</sup>. A Água apresentou o pior efeito dentre os produtos testados (Figura 2D)

Tabela 1- Número médio de nematóides vivos e de juvenis eclodidos após a exposição dos nematóides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. exigua* e *M. paranaensis* aos diferentes produtos biológicos.

Tratamentos	<i>Meloidogyne incognita</i>		<i>Meloidogyne javanica</i>		<i>Meloidogyne exigua</i>		<i>Meloidogyne paranaensis</i>	
	Nematóides Vivos	Juvenis Eclodidos	Nematóides Vivos	Juvenis Eclodidos	Nematóides Vivos	Juvenis Eclodidos	Nematóides Vivos	Juvenis Eclodidos
Água	221 b	1337,2 b	40 b	103,8 b	64,4 d	239,8 a	15,6 c	134,8 d
PI D2 *	165 b	1155,4 b	11 a	85,6 b	32 b	191,4 a	8,4 b	59,2 c
PI D4 *	167 b	1139,8 b	8 a	85,8 b	27 b	188,4 a	7,0 b	58,8 c
Nemix 2kg **	189 b	1122,2 b	8 a	98,6 b	35,4 b	199,2 a	9,8 b	39,2 b
Nemix 4kg **	135 b	1122,8 b	5 a	94,2 b	47 c	202,8 a	2,4 a	27,8 b
Nematicida	2 a	224,2 a	1,6 a	12,2 a	1,2 a	157,4 a	1,6 a	13,2 a
Coefficiente de Variação (%)	31,2	16,9	44,9	20,9	29,4	18,4	44,7	18,3

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

\* Produto biológico à base de *Bacillus* procedência japonesa.

\*\* Produto biológico composto por *Bacillus* sp procedência italiana.

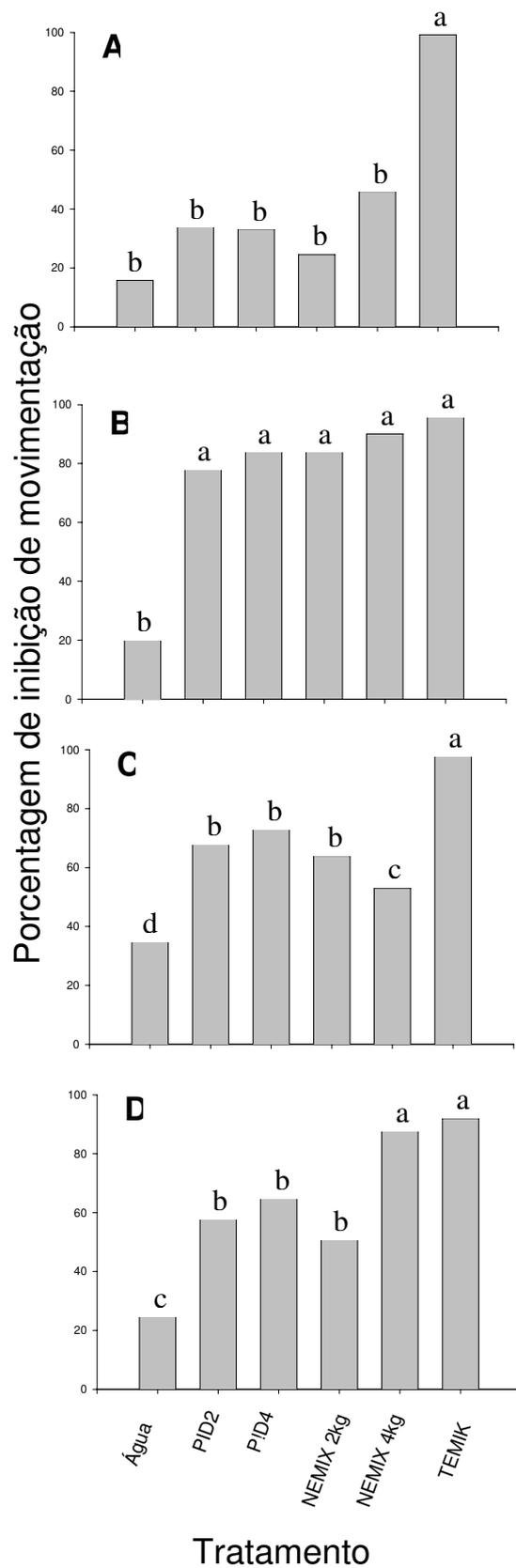


Figura 1- Porcentagem de inibição de movimentação de juvenis após efeito de produtos biológicos. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*; C: *M. exigua*; D: *M. paranaensis*.

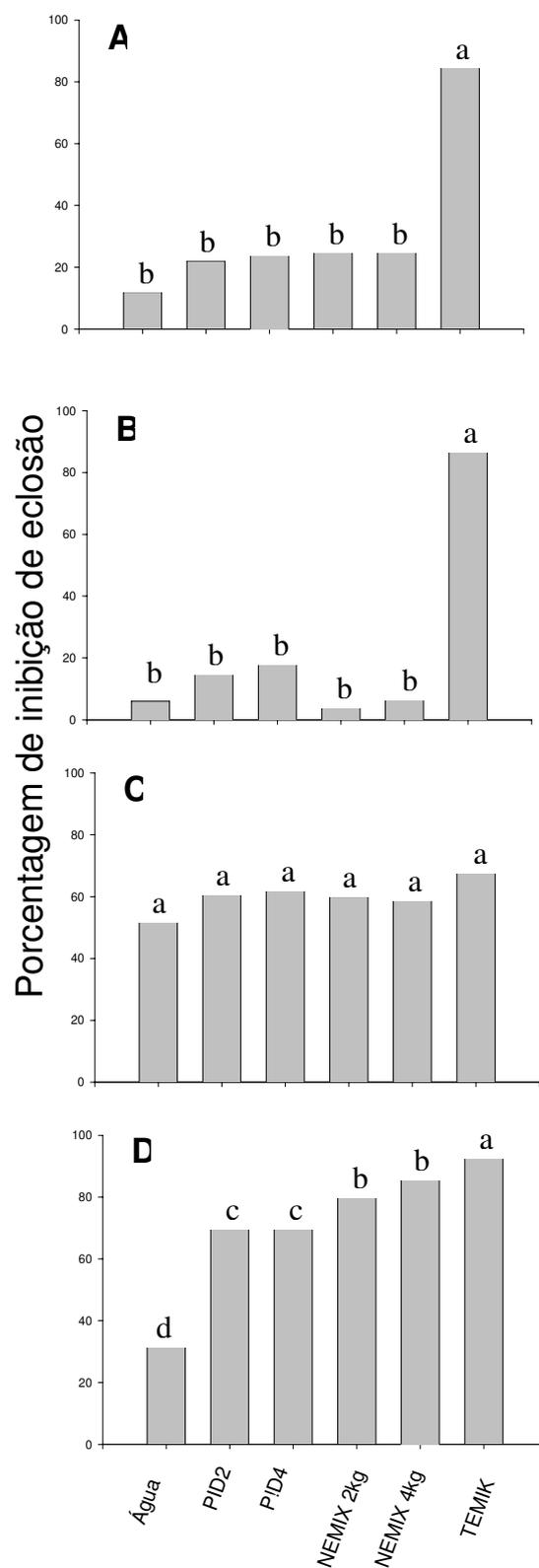


Figura 2- Porcentagem de inibição de eclosão após efeito de produtos biológicos. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*; C: *M. exigua*; D: *M. paranaensis*.

Quanto à atividade de rizobactérias no controle de nematóides, Araújo et al. (2002), revelam que nos trabalhos de laboratório a presença de *B. subtilis* reduz a eclosão de ovos de *Heterodera glycines* e o tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de juvenis de *H. glycines* para a planta. Em casa de vegetação houve redução de fêmeas na raiz quando o solo ou sementes foram tratados previamente com formulação pó-molhável ou calda contendo *B. subtilis*, respectivamente.

De acordo com Sottero et al. (2006), alguns isolados de bactérias do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* apresentaram competição *in vitro* contra *Fusarium* sp. de modo não determinado e não houve relação entre a promoção do crescimento e a competição *in vitro*.

Santos et al. (2006), relatam à eficiência do controle da mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) na cultura do melão, pelos fermentados de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. pumilis* C116 e *Bacillus* sp. MEN2, devido a produção de compostos ativos de lipopeptídeos com amplo espectro de atividade antimicrobiana.

Dados de Lazzaretti et al. (1997), revelam que o produto biológico formulado à base de *Bacillus subtilis*-PBBS (10% de células e 10% de metabólitos do isolado AP3) comportou-se semelhante ao fungicida benomyl (50g i.a./100kg semente) quanto ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*, quando aplicado às sementes de feijão.

Através do tratamento de sementes de várias culturas com um isolado de *Bacillus subtilis*, Sikora (1988) observou a redução de infecção de *Meloidogyne arenaria*, *M. incógnita* e *Rotylenchulus reniformis* em torno de 60 a 65%.

## 5 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos, pode-se concluir que:

Os produtos não apresentaram efeito na inibição da movimentação e na inibição da eclosão dos juvenis de *Meloidogyne incognita*.

Todos os produtos biológicos testados apresentaram-se eficientes quanto à inibição da movimentação de *Meloidogyne javanica*.

Os melhores resultados quanto à inibição da movimentação de *Meloidogyne exigua* foram proporcionados pelo produto biológico à base de *Bacillus* procedência japonesa, nas duas doses, e pelo Nemix 2 kg.ha<sup>-1</sup>.

Nemix 4 kg.ha<sup>-1</sup> apresentou efeito equivalente ao do produto padrão quanto à inibição da movimentação de *Meloidogyne paranaensis*, e quanto à inibição da eclosão, o produto mais eficiente foi Nemix nas duas doses.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S.G. de Crise Socioambiental e Conversão Ecológica da Agricultura Brasileira. **Folha de São Paulo**, Rio de Janeiro. 2001. Caderno Agrofolha. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/control.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2006.

ARAÚJO, F.F. Co-inoculação de bactérias: *Rhizobium e Bacillus*. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-CNPAP (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46), p. 376-381, 1994.

ARAÚJO, F.F.; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.197-203, 2002.

BACILLUS. Wikipedia. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus>>. Acesso em: 23 de nov. 2006.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p., 1981.

BOWEN, G.D.; FOSTER R.C. Dynamics of microbial colonization of plant roots. In: BROUGHTON, W. J.; JOHN, C. J. P. (Ed.) **Symposium of Soil Microbiology and Plant Nutrition**, University of Malaya Press, Kuala Lumpur, 1978, p 14-31.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus Nematóides**. [2002]. Disponível em: <[www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf](http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf)>. Acesso em: 09 mai. 2006.

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, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258.

GOMES C. B.; CAMPOS A. D. **Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. Embrapa, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/nemato.htm#galhas>>. Acesso em: 9 mar. 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A., **Microbiologia médica**, ed. 20, Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1998.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience Journal**, Uberlândia, v. 46, p. 406-409, 1996.

KLOEPPER, J. W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Measuring the spermosfere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, p.926-929, 1985.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWIXZ, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. Plant growthpromotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.). **The rhizosphere and plant growth**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 315-326, 1990.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1-2, s/ p, 1997.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1064 - 1068, 1995.

LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, n.1, p.16-20, 2001.

LYNCH, J.M. Microbial interaction around imbibed seeds. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 89, p. 165-167, 1978.

PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2 ed., São Paulo, SP, Makron Books, 1996.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 12, p. 77-84, 1989.

RACKE, J.; SIKORA., R.A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, p. 521-526, 1992.

ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos pela Microbiolização de Sementes com PGPR**. 1999. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/pelotas.html>> Acesso em: 25 jul. 2007.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection. **Virology**, Washington, v.14, p. 340-358, 1961.

SANTIAGO, D. C., HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1055-1064, 2006.

SANTOS, E.R.; GOUVEIA, E.R.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.32, n.4, p.376-378, 2006.

SASSER, J. N.; D. W. FRECKMAN. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W., (ed.) **Vistas on Nematology**. Maryland: Society of Nematologists, p. 7-14, 1987.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 339-358, 1987.

SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent**, Landbouww, v. 53, n.2b, p. 867-878, 1988.

SIKORA, R.A.; HOFFMANN-HERGATEN, S. Importance of plant health-promoting rhizobacteria for the control of soil-borne fungal diseases and plant parasitic nematodes. **Arabic Journal of Plant Protection**, Beirut, v. 10, n.1, p. 48-53, 1992.

SISTEMA de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT, 2007. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 28 mar. 2007.

SOTTERO, A. N.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; TRANI, P. E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**. Viçosa, v. 30, p. 225-234, 2006.

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

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

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, p. 1508-1512, 1991.