

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

***Streptomyces* ssp. E RESÍDUO DE SISAL NO CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica***

JOSILDA CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO – 2014

***Streptomyces* spp. E RESÍDUO DE SISAL NO CRESCIMENTO DO
TOMATEIRO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica***

JOSILDA CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cristina Fermino Soares

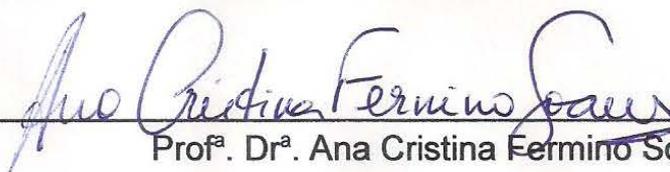
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

D155s	<p>Damasceno, Josilda Cavalcante Amorim <i>Streptomyces</i> spp. e resíduo de sisal no crescimento do tomateiro e controle de <i>Meloidogyne javanica</i> / Josilda C. A. Damasceno - Cruz das Almas, BA, 2014. 136 f.; il.</p> <p>Orientadora: Prof^a Ana Cristina Fermino Soares</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB.</p> <p>1. Sisal – Controle biológico. 2. Nematoda. 3. Controle Cultural. 4. Tomate – Doenças e pragas. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB. II. Título.</p> <p>CDD: 633.577</p>
-------	--

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

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE JOSILDA
CAVALCANTE AMORIM DAMASCENO



Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

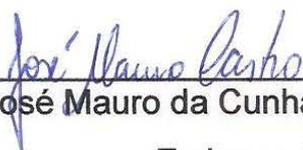
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

(Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Franceli da Silva

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB



Dr. José Mauro da Cunha e Castro

Embrapa Semiárido



Dr. Harllen Sandro Alves Silva

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical



Dr. Dimmy Herllen Silveira Gomes Barbosa

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Tese homologada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias

em

Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em

Aos meus eternos amores, Alisson e Alice (filhos queridos) - vocês são a minha fonte de inspiração! Ao meu amado esposo, Renato, pelo amor, paciência e apoio constantes.

DEDICO

A Deus, por permitir que eu queira sempre buscar ser uma pessoa melhor,

AGRADEÇO.

Agradecimentos

Ao meu Deus Todo Poderoso, autor da vida, pela realização e conclusão deste trabalho; por ser o meu Refúgio e Fortaleza, Socorro sempre presente nas horas de angústia, permitindo que eu chegasse até aqui; tendo lutas, mas sempre alcançando grandes vitórias;

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

À CAPES, pelo apoio financeiro e a concessão da bolsa de estudo;

Aos meus pais Jeremias e Crispina pelos ensinamentos;

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

Ao meu eterno e amado Renato, pelo apoio, paciência, compreensão, companheirismo e por sempre ter estado ao meu lado, me dando apoio e colaboração efetivos para a realização do meu trabalho;

Aos meus preciosos filhos, Alisson e Alice, presentes de Deus para a minha vida;

À professora Ana Cristina Fermino Soares, pela inestimável amizade, orientação, carinho, respeito, paciência, confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado. Sua confiança e perseverança foram fundamentais para a execução deste projeto;

Ao Dr. José Mauro da Cunha e Castro, pesquisador da Embrapa Semiárido, pela amizade e identificação dos nematoides;

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

Ao Dr. Ricardo Harakava, pela identificação molecular dos isolados de actinobactérias;

À Dra. Lydice Meira Haddad, pela sua colaboração inestimável para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Jefferson O. de Sá, pela amizade, sugestões e ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos doutorandos Juliana, Lica, Cris, Liane, Erasto e Adailson, pelo convívio e amizade;

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, Zozilene, Carol Yamamoto, Luana e Vitória, pela amizade e ajuda na condução deste trabalho;

Ao mestrando Fábio, pela confiança, amizade e ajuda no desenvolvimento das atividades;

À Rosane e ao Thiago, pelo apoio, amizade e ajuda para a realização dos trabalhos;

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola (Cristiano, Ilana, Emile, Carol, Rafa e Ane);

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (turma 2011.1), pelo carinho;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, pelo apoio;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, aqui deixo o meu MUITO OBRIGADO!.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01

Capítulo 1

<i>Streptomyces</i> spp. E ESTERCO BOVINO NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO E CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i>	23
---	----

Capítulo 2

RESÍDUO SÓLIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL (<i>Agave sisalana</i> Perrine ex Engelm) NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM TOMATEIRO.....	67
--	----

Capítulo 3

RESÍDUO LÍQUIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM TOMATEIRO.....	99
--	----

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
---------------------------	-----

ANEXOS.....	125
-------------	-----

Streptomyces* spp. E RESÍDUO DE SISAL NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica

Autora: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO: O tomateiro está entre as culturas hortícolas de maior consumo mundial e suscetível a infecção por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que causam perdas significativas de produção. Estratégias de manejo não químicas, a exemplo dos métodos de controle biológico e cultural apresentam elevado potencial para controle de fitonematoides. Este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial de isolados de *Streptomyces* spp. e do resíduo de processamento de folhas de sisal no crescimento do tomateiro e controle de *Meloidogyne javanica*. Em casa de vegetação, utilizando solo enriquecido ou não com esterco bovino, avaliou-se a eficiência de 10 isolados de *Streptomyces* spp. no controle de *M. javanica* em tomateiro. Foram avaliados também, o resíduo líquido (fresco e fermentado), o resíduo sólido seco e moído e o extrato aquoso deste resíduo sólido no controle da meloidoginose, sob condições *in vitro* e *in vivo*. O efeito da seletividade do resíduo líquido de sisal, sobre micro-organismos benéficos, foi avaliado em ensaios *in vitro*. O enriquecimento do solo com *Streptomyces* sp. (isolado BFT 102) causou a redução de até 87% no número de galhas e de 96%, no número de massas de ovos por grama de raízes de tomateiro, no solo sem esterco. Os isolados BFT 7 e BFT 71 causaram uma redução de 54% e de 65%, respectivamente, em ambos, o número de galhas e massas de ovos por grama de raiz, no solo com esterco. O extrato aquoso e o resíduo sólido seco e moído, os resíduos líquido fresco e líquido fermentado apresentaram efeito nematicida, com redução de 37%, 41%, 63% e 67% no número de galhas e de 39%, 39%, 95% e 97% no número de massas de ovos por grama de raízes, respectivamente. O resíduo fermentado inibiu o crescimento de micro-organismos benéficos do solo.

Palavras-chave: *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, nematoide-das-galhas, manejo cultural, *Solanum lycopersicum*, actinobactérias.

Streptomyces* spp. AND SISAL RESIDUE ON GROWTH OF TOMATO PLANTS AND CONTROL OF *Meloidogyne javanica

Author: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno

Advisor: Prof^a Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT: Tomato is amongst the most consumed vegetable crops worldwide, and is susceptible to the infection by nematodes of the genus *Meloidogyne*, which cause significant yield losses. Non-chemical management strategies such as biological and cultural control have high potential to control plant parasitic nematodes. This study aimed to evaluate the potential of isolates of *Streptomyces* spp. and residues from sisal leaf decortication process for growth promotion of tomato plants and control of *Meloidogyne javanica*. Ten isolates of *Streptomyces* spp. were evaluated for their efficiency for controlling *M. javanica* in tomato plants grown under green house conditions, in soil with and without cattle manure. In addition, the liquid residue (fresh and fermented), the solid dry and powdered residue and the aqueous extract of this residue were tested for control of *M. incognita* under *in vitro* and greenhouse conditions. The selectivity effect of the sisal liquid residue on beneficial microorganisms was evaluated through *in vitro* assays. Soil enrichment with *Streptomyces* sp. (isolate BFT 102) caused a reduction of up to 87% in the number of galls and of 97% in egg masses per gram of tomato roots, in soil without cattle manure. Isolates BFT 7 and BFT 71 caused a reduction of 54% and 65%, respectively, in both the number of galls and egg masses per gram of roots, in the soil with manure. The aqueous extract and the ground powdered solid dry residue, the liquid residues fresh and fermented had nematicide effect with reductions of 37%, 41%, 63% and 67% in the number of galls and 39%, 39%,bb 95% to 97% in the number of eggs per gram of roots, respectively. The fermented liquid residue inhibited growth of beneficial soil microorganisms.

Keywords: *Agave sisalana* Perrine ex. Engelm, root-knot nematode, cultural management, *Solanum lycopersicum*, actinobacteria.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*), originário da região andina e pertencente à família Solanaceae, é uma hortaliça cosmopolita, conhecida e consumida em todo o mundo, devido sua multiplicidade na alimentação humana e ativa participação na cadeia comercial. (ALVARENGA, 2004). Superado apenas pela batata, o tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, ocupando a segunda posição em volume de produção, sendo que o tomate pode ser consumido tanto fresco quanto processado (FILGUEIRA, 2003).

Em termos mundiais, o Brasil ocupou a 8ª posição na produção de tomate em 2012, com produtividade estimada de 58,712 t/ha e em uma área de 65,621 mil ha (IBGE, 2014).

São muitos os fatores limitantes à produção de tomate no Brasil, com destaque para a suscetibilidade a diversos patógenos, que reduzem a produção de forma significativa. Entre estas doenças, destaca-se a meloidoginose que reduz a produtividade e é de difícil controle (SILVA et al., 2004).

Fitonematoides na cultura do tomateiro

Os nematoides constituem o grupo de organismos pluricelulares mais abundantes no planeta, estimados em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991; KIMPINSKI e STURZ, 2003). Dentre os grandes grupos, estão os fitonematoides, ou nematoides parasitas de plantas, que causam perdas econômicas significativas em várias culturas, dentre estas, o tomateiro (FERRAZ e MONTEIRO, 1995). Alimentam-se e reproduzem-se em plantas vivas, podendo migrar para a região rizosférica, para o interior das raízes ou em direção à parte aérea.

No Brasil, existem 43 espécies de fitonematoides em 21 gêneros associados ao tomateiro e as espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* provocam sintomas típicos como as galhas e lesões nas raízes, respectivamente (KUROZAWA e PAVAN, 2005). As espécies de *Meloidogyne*, conhecidas como nematoides-das-galhas por causarem engrossamento das raízes, são consideradas as mais importantes, pelos danos causados e pela dificuldade do seu controle na cultura do tomateiro. Além disso, este gênero possui ampla distribuição geográfica e apresenta extensa gama de hospedeiras, incluindo mais de 2.000 espécies de plantas, dentre elas, diversas culturas de importância econômica (PIO-RIBEIRO e ASSIS FILHO, 2005). As espécies *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood são as mais comuns no País, estando presentes em todos os tipos de solo.

Tomateiros, quando infectados pelos nematoides-das-galhas, apresentam redução do tamanho e da eficiência do sistema radicular (CANTU et al., 2009; ZAMBIASI e BELOT, 2010), folhas reduzidas e amareladas, intensa murcha nas horas mais quentes do dia, em consequência da abundante formação de galhas na raiz prejudicando a absorção de água e nutrientes (CHARCHAR e LOPES, 2005). O cultivo em áreas com altas infestações de *Meloidogyne* spp. pode levar à morte de mudas no campo e afetar negativamente a produção das plantas sobreviventes (CANTU et al., 2009).

Os nematoides causam consideráveis prejuízos econômicos anuais à cultura do tomateiro em todo o mundo, sendo que 14 a 44 % das perdas podem ocorrer em plantas cultivadas sob ambiente protegido (CHARCHAR e ARAGÃO, 2005; CORTADA et al., 2010). Essas perdas variam de acordo com a época de plantio e com as práticas culturais adotadas pelos produtores e, na produção, observam-se danos que variam de leves a severos.

A contaminação de áreas agrícolas por nematoides e a disseminação em novas áreas ocorrem, principalmente, por água de irrigação ou de chuva, por solo aderido a máquinas agrícolas e por material propagativo infectado como mudas e sementes (AGRIOS, 2004). A tentativa de controle de nematoides geralmente é realizada com o uso de nematicidas. Porém, este método tem apresentado problemas de uso inadequado, biodegradação dos princípios ativos no solo, além da contaminação de pessoas durante a aplicação, impacto ambiental pela morte de animais e poluição do meio ambiente, principalmente da água do lençol freático

pela percolação dos ingredientes ativos tóxicos com a chuva ou irrigação (GUIMARÃES, 2011).

A adoção de métodos sustentáveis de manejo de nematoides tem ganhado espaço em todo o mundo, a exemplo do controle biológico e a incorporação de matéria orgânica ao solo (FERRAZ et al., 2010).

Actinobactérias como agentes de biocontrole e promoção de crescimento

Entre as alternativas na redução do uso de agrotóxicos, o controle biológico tem-se apresentado eficiente no manejo e/ou controle de doenças de várias culturas e por também minimizar os problemas com contaminação ambiental e ser mais vantajoso economicamente, comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA, 2005).

O controle biológico pode ser definido como a redução da população de determinado patógeno por outro organismo vivo, geralmente um micro-organismo, por meio de antibiose, parasitismo, predação, competição ou hipovirulência (VENZON et al., 2005) e visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL e MORANDI, 2009).

Pode ocorrer por meio da alteração das condições ambientais, visando o favorecimento da atividade de micro-organismos antagonistas já presentes na área de interesse, como também por meio da introdução de um ou mais agentes de controle biológico previamente selecionados (BETTIOL e MORANDI, 2009). Após a introdução do agente microbiano de biocontrole, deve ocorrer o seu estabelecimento em um nicho, seguido da interação com o organismo alvo e outras espécies de organismos. Essas complexas interações são fundamentais para o sucesso do controle (GHINI e BETTIOL, 2009).

O organismo é considerado agente de controle biológico quando apresenta capacidade de colonização e competitividade no ambiente do patógeno. A adaptação ao ambiente do patógeno; resistência a fatores ambientais como temperatura, dessecação, radiação, presença de produtos químicos; o fácil cultivo ou multiplicação, não ser patogênico ao homem ou animais; ter a capacidade de atuar em diferentes plantas hospedeiras e ter amplo espectro de

ação contra diferentes patógenos; apresentar compatibilidade com agrotóxicos no uso em manejo integrado e com outros antagonistas para uso em misturas; sobrevivência, persistência e capacidade de redistribuição; baixa frequência de mutações, são características desejáveis em agentes de controle biológico (BETTIOL, 1991).

As rizobactérias são micro-organismos com alto potencial benéfico, pois, atuam como agentes de biocontrole pela competição por nutrientes com o patógeno, a produção de metabólitos secundários, de sideróforos, de antibióticos, a resistência induzida a doenças, produção de enzimas que atuam na lise de células fúngicas e de nematoides, tais como, a quitinase, a β -1,3-glucanase, a protease e a lipase que, quando secretadas por estes micro-organismos, podem reduzir o crescimento de fitopatógenos presentes na região rizosférica. Além disso, podem também promover o crescimento das plantas pela produção de reguladores vegetais de crescimento ou moléculas análogas e a fixação biológica de nitrogênio ou solubilização de fósforo (KLOEPPER, 1993; NEHL et al., 1996; WHIPPS, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001; ZAITLIN et al., 2004; COMPANT et al., 2005; PÁDUA et al., 2007; COMPANT et al., 2009).

Os principais grupos de micro-organismos promotores de crescimento de plantas pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces* (SINGH e MEHROTRA, 1980; PIZZANATO e FREITAS, 1996).

Dentre os agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas, as actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentam um papel importante na rizosfera das plantas, por influenciarem o seu crescimento, colonizando as raízes e agindo contra fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos (RAUPACH e KLOEPPER, 1998; COMPANT et al., 2005; DAMASCENO, 2011). Destacam-se pela produção de enzimas extracelulares, de antibióticos e de outros metabólitos secundários, pela decomposição da matéria orgânica, especialmente, polímeros de lignocelulose, amido e quitina (GOODFELLOW, 1988; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; GETHA et al., 2005; RAJU et al., 2010).

As actinobactérias, comumente encontradas no solo, são de ocorrência nos diferentes ecossistemas em função da sua diversidade metabólica e da evolução de mecanismos específicos de dispersão (ARAÚJO, 1998; OTINIANO et al., 2006; BALLAV et al., 2012). Produzem ampla diversidade de metabólitos

secundários e o gênero *Streptomyces* é o mais estudado e responsável por mais de 50% dos metabólitos microbianos bioativos (BUTLER, 2008; OLANO et al., 2011).

As actinobactérias produzem elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes às hifas fúngicas (SCHLEGEL, 1993). São capazes de colonizar a rizosfera e se reproduzem pela formação de esporos, apresentando, assim características desejáveis para o controle biológico de doenças de plantas (MOURA, 1996). Os esporos constituem a principal forma de multiplicação e são produzidos em grande número; cada esporo com potencial de germinação e crescimento, levando ao surgimento de um novo organismo. Embora não sejam resistentes ao calor, os esporangiósporos são resistentes às dessecações e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem (VENTURA et al., 2007).

Estudos demonstraram o potencial das actinobactérias como agentes de controle biológico dos nematóides *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus penetrans*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Radopholus citrophilus* e *Scutellonema bradys*, em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, citrus (*Citrus* spp.), tomateiro (*Solanum lycopersicum*), inhame (*Dioscorea cayennensis*) e bananeira (*Musa* spp.) (WALTER e KAPLAN, 1990; JONATHAN et al., 2000; COIMBRA et al., 2004; SOUSA, 2006; PAIXÃO, 2008; SOUSA et al., 2009; COIMBRA e CAMPOS, 2010; DAMASCENO, 2011; SANTOS, 2013).

A introdução de actinobactérias no solo pode trazer benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, ser uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (SCHROTH et al., 1982; LAVIE e STOTZKY, 1986).

Controle dos nematoides-das-galhas com esterco bovino e *Streptomyces* spp.

A incorporação da matéria orgânica ao solo é também alternativa de controle dos nematoides-das-galhas nas plantas. A decomposição da matéria orgânica no solo aumenta os teores de nutrientes disponíveis no crescimento vegetal, contribuindo para a nutrição das plantas, estimula o desenvolvimento de inimigos naturais dos nematoides, induz a resistência a fitopatógenos e, ainda,

produz compostos que são tóxicos aos nematóides (AKHTAR e MALIK, 2000; HALBRENDT e LaMONDIA, 2004; OKA, 2010; THODEN et al., 2011).

A ação tóxica da decomposição da matéria orgânica por micro-organismos, a exemplo, das actinobactérias, pode estar relacionada com a produção e liberação da quitinase. A quitinase promove o rompimento da camada de proteção dos ovos dos nematoides, resultando na eclosão prematura do estágio juvenil (MIAN e RODRIGUEZ-KABANA, 1982; STIRLING, 1991; RITZINGER e FANCELLI, 2006).

O melhor aproveitamento de substratos orgânicos pode ser ainda obtido com a inoculação das plantas ou com a infestação do substrato com micro-organismos benéficos ao crescimento de plantas (SOUSA et al., 2006), seguido da incorporação de alguma fonte de matéria orgânica (ÇAKMAKÇI et al., 2006).

Machado et al. (2013) relataram que a incorporação ao solo de esterco bovino, juntamente com *Pochonia chlamydosporia*, promoveu o crescimento do tomateiro e houve maior redução no número de galhas e de ovos de *M. javanica* com a aplicação somente de esterco bovino, seguido pela junção do esterco e fungo.

Siddiqui et al. (2001) testaram dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* em combinação com esterco bovino e fertilizante inorgânico em tomateiro, objetivando o controle de *M. incognita* e observaram que houve redução no número de galhas e promoção de crescimento das plantas.

Resíduo do sisal no controle dos nematoides-de- galhas

Um composto orgânico que pode ser utilizado como controle alternativo de nematoses é o resíduo do desfibramento das folhas de sisal. *Agave sisalana* Perrine ex. Engelm, popularmente conhecida como sisal, pertencente à família Agavaceae, compreende mais de 650 espécies distribuídas nas regiões áridas de clima tropical do mundo (ABDEL-GAWAD et al., 1999). É uma planta que sobrevive em ambientes com baixa precipitação pluviométrica e elevada temperatura. Esta espécie tem sua origem no México e encontra-se amplamente distribuída no Nordeste do Brasil e no Leste da África. A agaveicultura ocupa uma extensa área de solos pobres do Semiárido de alguns estados do Nordeste,

sendo esta, a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios para a região (SUINAGA et al., 2006).

O sisal é a principal fonte de fibras duras vegetais do mundo, sendo responsável por quase 70% da produção comercial de todas as fibras desse tipo. O Brasil é o maior produtor e exportador de fibras e manufaturados de sisal e o cultivo ocorre em 112 municípios do Nordeste, sendo o Estado da Bahia, o maior produtor nacional de fibra de sisal, concentrando 95% da produção sisaleira do País (SECTI, 2014).

Na Bahia, o Território do Sisal, está localizado na Microrregião Nordeste do Estado e abrange os municípios de Araci, Barrocas, Biringa, Candeal, Cansação, Conceição do Coité, Ichu, Itiúba, Lamarão, Monte Santo, Nordestina, Queimadas, Quijingue, Retirolândia, Santaluz, São Domingos, Serrinha, Teofilândia, Tucano e Valente. A Microrregião Piemonte da Diamantina conta com 12 municípios com produção significativa. Nesta região, 92,8% das 29,5 mil propriedades rurais são familiares, cuja área média é de 23,73 ha. A outra Microrregião produtora de sisal é a de Paraguaçu, onde existem nove municípios com plantio significativo desta cultura (SECTI, 2014).

O principal produto da exploração do sisal é a fibra e esta, naturalmente, resistente e de fácil industrialização, tem sido procurada por muitos investidores e ocupado lugar de destaque, devido a sua ampla utilização doméstica, industrial e, mais recentemente, no reforço de compósitos poliméricos (MARTIN et al., 2009).

A fibra do sisal é utilizada para produzir artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft (de alta resistência), também tem sido utilizada na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, de geotêxteis (proteção de encostas, na agricultura e revestimento de estradas), na mistura com polipropileno, em substituição à fibra de vidro (composição de objetos plásticos) e na construção civil (PROSSIGA, 2004).

O resíduo de sisal tem sido utilizado na adubação orgânica (BANDEIRA e SILVA, 2006), como suplemento alimentar de ruminantes (SOUZA et al., 2007; GEBREMARIAM e MACHIN, 2008) e como matéria-prima na produção de medicamentos (DEBNATH et al., 2010), mas grande parte ainda é abandonada

no campo de cultivo, sem sequer ser incorporado ao solo (RODRIGUEZ et al., 2008).

A fibra de sisal representa somente 4% da folha e os resíduos sólidos e aquosos constituem os restantes 96%, (BANDEIRA e SILVA, 2006; SUINAGA et al., 2006), que são abandonados nas propriedades rurais, sem qualquer aproveitamento (Anexo, Figs A, B, C, D e F). Assim, são desperdiçados os tecidos da planta que contêm lignina e celulose, metabólitos primários e secundários e água, dentre outros.

O resíduo líquido de sisal, tem como principais constituintes do metabolismo secundário: alcaloides, compostos fenólicos, glicosídeos, cumarinas, saponinas, flavonoides e taninos (NEGESSE et al., 2009; BARRETO, 2010). A composição química nutricional do sisal é de cerca de 29,2% de fibra bruta; 5,3% de proteínas; 3,1% de lipídios; 13,1% de cinzas e 21,2% de carboidratos (SILVA et al., 1999).

As saponinas desempenham um papel importante na defesa contra insetos e micro-organismos (AGRELL et al., 2003) e sua concentração é diretamente proporcional ao estágio de desenvolvimento da planta (HART et al., 2007). A atividade biológica das saponinas está relacionada com a capacidade de formar complexos com esteroides; proteínas e fosfolipídeos das membranas, o que pode ocasionar a desestabilização das membranas e consequente aumento da permeabilidade celular (SCHENKEL et al., 2010). A ação dos flavonoides sobre parasitos tem sido associada às alterações na atividade de várias enzimas e/ou nos processos metabólicos (KERBOEUF et al., 2008). Sua diversidade estrutural influencia sobre as propriedades biológicas e físico-químicas (SPARG et al., 2004; VINCKEN et al., 2007).

Estudos têm evidenciado que o sisal apresenta ação biocida contra nematoides em caprinos (DOMINGUES et al., 2010; BOTURA et al., 2011), contra o carrapato bovino (PIZARRO, 1998), contra larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (PIZARRO, 1999) e ácaros (BARRETO, 2010). Além disso, há relatos de propriedades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral (SCHENKEL et al., 2004). Estas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas às saponinas esteroidais, especialmente a hecogenina, frequentemente, utilizada pela indústria farmacêutica na semi-síntese de

esteroides como corticosteroides, hormônios sexuais e diuréticos (GARCÍA et al., 2000; SPARG et al., 2004).

O efeito nematicida pode estar associado à ação de metabólitos secundários com atividade biológica, presentes no resíduo do sisal (ZULLO et al., 1989; FRANCIS et al., 2002). As saponinas presentes na fração aquosa de *A. sisalana* interagem com as proteínas da cutícula do nematoide promovendo efeito nematicida (ARGENTIERE et al., 2008).

Icbal et al. (2007) demonstraram em ensaio *in vitro* que taninos condensados reduzem a eclosão e o desenvolvimento de nematoides parasitas de ruminantes. Maistrello et al. (2010) observaram o efeito de taninos provenientes de castanhas no controle de *M. javanica* sob condições *in vitro* e *in vivo*. Entre os efeitos dos taninos em micro-organismos, Scalbert (1991) relaciona a capacidade deste fitoquímico de reagir com membranas, modificando a sua integridade e inibindo a fosforilação oxidativa.

Verastegui et al. (1996), em uma avaliação com extratos etanólicos de *A. lechiguilla* contra 20 micro-organismos, observaram elevada atividade antimicrobiana desta planta, com ação no controle de *Clostridium perfringens* e *Shigella dysenteriae* e de 11 espécies de fungos. Em outro trabalho, Verastegui et al. (2008) examinaram a atividade biológica de extratos de folhas de quatro espécies de agave (*A. lecheguilla*, *A. picta*, *A. scabra* e *A. iophanta*), e mostraram que todos os extratos testados foram ativos contra o fungo *Cryptococcus neoformans*. Barreto et al. (2004) trataram sementes de algodoeiro com extrato curtido de *A. sisalana* e observaram menores incidências dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.

Soares e Damasceno (2011) utilizaram o resíduo líquido do sisal em ensaio *in vitro*, no controle de *M. javanica*, e verificaram que o resíduo nas concentrações entre 2,5% a 10% causou mortalidade nos juvenis de segundo estágio de *M. javanica*, variando de 86% a 92%, e nas concentrações acima de 12,5% houve 100% de mortalidade após 48 horas de exposição dos nematoides a este resíduo.

Neste contexto, o presente trabalho teve os objetivos de estudar: a promoção de crescimento de tomateiro e o controle de *M. javanica* com actinobactérias e com a incorporação de esterco bovino e pelo emprego do

resíduo líquido (fresco e fermentado) e do resíduo sólido seco (extrato aquoso e pó moído) de sisal no controle de *M. javanica* no tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, M.M.; EL-SAYED, M.M. ABDEL-HAMED, E.S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Revista Fitoterapia**, v.70, p. 371-381, 1999.

AGRELL, J.; WIESLAW, O.; STOCHMAL, A.; OLSEN, M.; ANDERSON, P. Herbivore-Induced Responses in Alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Chemical Ecology**, v.29, p. 303-320, 2003.

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

ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA. 2004. 400p.

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 35–47, 2000.

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

ARGENTIERI, M.P.; D'ADDABBO, T.; TAVA, A.; AGOSTINELLI, A. JURZYSTA, M.; AVATO, P. Evaluation of nematocidal properties of saponins from *Medicago* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 189-197, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Tomaticultura: valioso segmento do agronegócio nacional**. Disponível em:

<<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=2420>>. Acesso em: 05 de novembro de 2012.

BALLAV, S.; DASTAGER, S.G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, p. 31-39, 2012.

BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.58-61.

BARRETO, A.F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B.F.; SILVA, O.R.R.F.; BELÉM, L.F. Qualidade fisiológica e a incidência de fungos em sementes de algodoeiro herbáceo tratadas com Extratos de agave. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras**, Campina Grande, v.8, p.839-849, 2004.

BARRÊTO, A.F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B.F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 207-215, 2010.

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

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas. Embrapa, 2009, 341p.

BOTURA, M.B.; SILVA, G.D.; LIMA H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; SOUZA, T.S.; SANTOS J.D.G.; BRANCO, A.; MOREIRA, E.L.T.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M. *In vivo* anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v.177, p. 104-110, 2011.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475–516, 2008.

CAKMAKCI, R., F.; DONMEZ, A. AYDÍN.; F. SAHIN. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, 1482-1487.

CANTU, R.R.; WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; GOTO, R.. Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.216-218, 2009.

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

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

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

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

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

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

CORTADA, L.; SORRIBAS, F.J.; ORNAT, C.; ANDRÉS, M.F.; VERDEJO-LUCAS. Patrones de tomate resistentes a *Meloidogyne*: Variabilidad de La respuesta de resistencia en función de la población del nematodo. **Horticultura Global**, v. 288, p. 40-45. 2010.

DAMASCENO, J.C.A. **Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de tomateiro**. 2011, 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2011.

DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARMA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, p.177-187, 2010.

DOMINGUES, L.F.; BOTURA, M.B.; CRUZ, A.C.F.G.; YUKI, C.C.; SILVA, G.D.; COSTA, M.S.; MURPHY, G.; MOREIRA, E.L.T.; MENESES, I.D.S.; ALMEIDA, M.G.A.R.; BRANCO, A.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 270-272, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em 22 de agosto de 2013.

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

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo sustentável de fitonematoides, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

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

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, v. 88, p. 587-605, 2002.

GARCÍA, M.D.; QUÍLEZ, A.M.; SÁCNZ, M.T.; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, M.E.; LA PUERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.395-400, 2000.

GEBREMARIAM D.Y.; MACHIN, D.H. Evaluation of sun dried sisal pulp (*Agave sisalana* Perrine) as feed for sheep in Eritrea. *Livestock Research for Rural Development*, v. 20, 2008. (On-line edition).

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

GHINI, R.; BETTIOL, W. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341 p. 2009.

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

GUIMARÃES, C.P. **Controle de fitonematoides na cultura da bananeira no Norte de Minas Gerais**. 2011, 90 f. Mestrado (Produção Vegetal no Semiarido), Unimontes, Minas Gerais, 2011.

HALBRENDT, J.M.; LaMONDIA, J.A. Crop rotations and other cultural practices. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKINSON, D.W. (ed). **Nematology – Advances and Perspectives**. Volume II: Nematode Management and Utilization. Tsinghua University Press & CABI Publishing, p. 909-930. 2004.

HART, K.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; DUVAL, S.M.; McEWAN, N.R.; NEWBOLD, C.J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 8-35, 2008.

IBGE . Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <[http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2013/lspa_201308.pdf](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2013/lspa_201308.pdf) >. Acesso em 22 de Agosto 2014.

ICBAL, Z.; SARVAR, M.; JABBAR, A.; AHMED, S.; NISA, M.; SAJID, M.S.; KHAN, M.N.; MUFTI, K.A.; YASSEN, M. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.125-131, 2007.

JONATHAN, E. L.; BARKER, K.R.; ABDEL-ALIM, F.F.; VRAIN, T.C.; DICKSON, D.W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v. 30, n. 02, p. 231-240, 2000.

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, p.116-128, 2008.

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

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting, B. (Ed.). **Soil Microbial Technologies**. 1993. pp. 255-274.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005, p.607-626.

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Interactions between clay minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 74-79, 1986.

MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; CANEDO, E.J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e esterco bovino. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 590-596, 2013.

MAISTRELLO, L.; VACCARI, G.; SASANELLI, N. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Helminthologica**, v. 47, p. 48-57, 2010

MARTIN, A. R.; MARTINS, M.A.; MATTOSO, L.H.C.; SILVA, O.R.R.F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, São Carlos, v. 19, p. 40-46, 2009.

MIAN, I.H.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Survey of the nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendments to soil for control of *Meloidogyne arenaria*. **Nematropica**, v.12, p.235-246, 1982.

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

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

NEGESSE, T.; MAKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an

in vitro gas method. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, p.204-217, 2009.

NEHL, D.B.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 144–164, 2011.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments – A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, p. 101–115, 2010.

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

PÁDUA, R.R.; ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; MELLO, S.C.M. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 165, 23p., 2007.

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

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

PIZARRO, A.P.B.; Utilização do extrato de agave *Americana Linnaeus* no controle de *Boophilus microplus*, **Veterinária Notícias**, v.4, p. 137-138, 1998.

PIZARRO, A.P.B.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; PARENTE, J.P.; MELO, M.V.; SANTOS, C.E. O aproveitamento do resíduo da indústria do Sisal no controle de larvas de mosquito. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 23-29, 1999.

PIZZINATTO, M.A.; FREITAS, S.S. Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre a sanidade e a germinação de sementes e o desenvolvimento de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.22, p. 9-14, 1996.

PROSSIGA. Panorama do setor de sisal no Estado da Bahia. Disponível em: <http://www5.prossiga.br/arranjos/vortais/sisal_ba_panorama1>. Acesso em: 4 fev. 2011.

RAJU, A.; PIGGOTT, A.M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopepsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopepsis* sp. **Chemistry European Journal**, v.16, p. 3194 – 3200, 2010.

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

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

RITZINGER, C.H.S.P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 331-338, 2006.

RODRIGUEZ, A.L.; SUÁREZ, J.S.; HORTA, J.Z.J.; JÁCOME, A.G. Comportamento da digestão anaeróbica do resíduo líquido da indústria de sisal

em escala piloto. **Revista em Agronegócios e Meio ambiente**, v.1, p. 77-86, 2008.

SANTOS, J.F. **Actinobactérias e adubação orgânica no manejo de *Scutellonema bradys* no crescimento e nutrição de plantas de inhame**. 2013. 105f Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p. 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 27, p.711-734.

SCHLEGEL, H. G. **General Microbiology**. 7.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, v. 216, p. 1376-1381, 1982.

SECTI. Projeto Sisal de Base Tecnológica. Disponível em: <http://www.secti.ba.gov.br/wp-content/uploads/2013/01/PROJETO-SISAL-DE-BASE-TECNOLOGICA.pdf>. Acesso em 05 jan. 2014.

SIDDIQUI, Z.A.; IQBAL, A.; MARMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p.179-185, 2001.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E.M. (Eds.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa SPI; Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1999. p. 205.

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

SILVA, V.C.; CARVALHO, M.G.; BORBA, H.R.; SILVA, S.L.C. Atividade anti-helmíntica dos flavonoides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.573-576, 2008.

SINGH, P. J.; MEHROTRA, R. S. Biological control of *Rhizoctonia bataticola* on gram by coating seed with *Bacillus* and *Streptomyces* spp. and their influence on plant growth. **Plant and Soil**, v.56, p.475-483. 1980.

SOARES, A.C.F.; DAMASCENO, J.C.A. Control of *Meloidogyne javanica* in lettuce plants with sisal (*Agave sisalana*) liquid waste. In: III Congreso Latinoamericano de Agroecología: Para alcanzar la soberanía alimentaria en un planeta en crisis ambiental, energética y climática, México, 2011.

SOUSA, C.S. **Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro**. 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2006.

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

SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SENA, M.G.C.; MOURA, C. Aproveitamento multiuso do resíduo do sisal: uma experiência que está dando certo, 2007. Disponível em <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/27193.htm>>. Acesso em 12 julho 2011.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E; STADEN, J. VAN. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

STIRLING, G.R. **Biological control of plant-parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1991. 282p.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.;COUTINHO, W.M. Cultivo de Sisal na região Semi-árida do nordeste brasileiro. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, v.5, 42p, 2006.

THODEN, T.C.; KORTHALS, G.W.; TERMORSHUIZEN, A.J. Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: a promising method for nematode management? **Nematology**, v. 13, p. 133–153, 2011.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, p. 495–548, 2007.

VERASTEGUI, A.; SANCHES, C.A.; HEREDIA, N.; GARCIA-ALVARADO, J.S. Antimicrobial activity of extracts of three Chihuahuan desert major plants from the Chihuahuan desert. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 175-177, 1996.

VERASTEGUI, A.; VERDE, J.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N.; ORANDAY, A.; RIVAS, C. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1249-1252, 2008.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: UFV, 2005.

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

VINCKEN, J.P.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, p. 275-297, 2007.

WALTER, D.E.; KAPLAN, D.T. Antagonists of Plant-parasitic Nematodes in Florida Citrus. **Journal of Nematology**, v. 22, p. 567-573, 1990.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 487-511, 2001.

ZAITLIN, B.; TURKINGTON, K.; PARKINSON, D.; CLAYTON, G. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 53-62, 2004.

ZAMBIASI, T.; BELOT, J. L. Proteção integrada. **Revista Cultivar**, p. 10, 2010. (Caderno Especial Pragas).

ZULLO, M.A.T.; AZZINI, A.; SALGADO, A.L.B; CIARAMELLO, D. Sapogeninas esteroídicas em sisal. **Bragantia**, v.48, p. 21-25, 1989.

CAPÍTULO 1

Streptomyces* spp. E ESTERCO BOVINO NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial do periódico científico Scientia Agricola

Streptomyces* spp. E ESTERCO BOVINO NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO E CONTROLE DE *Meloidogyne javanica

Autores: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno, Rosane da Silva Sant'ana, Fábio Nascimento de Jesus, Ana Cristina Fermino Soares, Ricardo Harakava

RESUMO: As actinobactérias são importantes no biocontrole e promoção de crescimento de plantas. O trabalho teve o objetivo de estudar o potencial de uso de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e de esterco bovino no manejo de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Avaliaram-se a incubação do solo com dez isolados de *Streptomyces* spp. e o equivalente a 30t ha⁻¹ de esterco bovino, seguido do plantio de tomateiro e inoculação com *M. javanica*. Aos 40 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto ao crescimento e o dano nas raízes. Os estreptomicetos foram caracterizados segundo aspectos morfológicos e moleculares e quanto à produção de enzimas extracelulares. Também, foram avaliados a colonização radicular, o crescimento dos estreptomicetos em diferentes valores de pH e a densidade populacional destes no solo. Os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Os isolados BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 102, BFT 106 e PD 3 apresentaram 99,0% de identidade com *Streptomyces albolongus* e *S. cavourensis*. Não foi possível a identificação do isolado BFT 88, embora o mesmo tenha apresentado 99% de similaridade com o gênero *Streptomyces*. Sessenta por cento dos isolados produziram amilase e todos demonstraram ser produtores da enzima catalase, colonizaram as raízes das plântulas sob condições *in vitro*, cresceram em todos os valores de pH e colonizaram o substrato. Houve redução no número de galhas e de massas de ovos por grama de raízes de tomateiro em até 87,1% e 96,0% com o isolado BFT 102 no solo sem esterco. No solo com o esterco bovino, essas reduções foram de 53,7% (isolado BFT 7) e 65,4% (isolado BFT 71), respectivamente. Os estreptomicetos com ou sem o uso de esterco bovino promoveram o controle de *M. javanica* no tomateiro.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, nematoide-das-galhas, actinobactérias., adubação orgânica, colonização radicular.

Streptomyces* spp. AND CATTLE MANURE ON GROWTH OF TOMATO PLANTS AND CONTROL OF *Meloidogyne javanica

Authors: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno, Rosane da Silva Sant'ana, Fábio Nascimento de Jesus, Ana Cristina Fermino Soares, Ricardo Harakava

ABSTRACT: Actinobacteria are important in biological control and plant growth promotion. This work aimed to study the potential use of actinobacteria of the genus *Streptomyces* and the use of cattle manure for management of *Meloidogyne javanica* in tomato plants. The soil was enriched and incubated with ten selected isolates of *Streptomyces* spp. and with cattle manure at the equivalent dose of 30t ha⁻¹. After incubation, tomato seedlings were transplanted and inoculated with *M. javanica*. Forty days after inoculation, the plants were harvested and evaluated for growth and root damage. The streptomycetes were characterized according to morphological and molecular aspects and their production of extracellular enzymes. Also, root colonization, growth of *Streptomyces* at different values of pH and soil population density of the *Streptomyces* isolates were evaluated. The isolates were identified as belonging to the genus *Streptomyces*. Isolates BFT 4, 7 BFT, BFT 11, 41 BFT, BFT 71, BFT 87, BFT 102, BFT 106 and PD 3 showed 99.0% similarity with *Streptomyces albolongus* and *S. cavourensis*. It was not possible to identify the isolated BFT 88, although it presented 99% similarity with the genus *Streptomyces*. Sixty percent of the isolates produced amylase, all isolates produced catalase, colonized tomato roots *in vitro*, grew at all pH values, and were also able to grow and colonize the soil. There was a reduction in the number of galls and egg masses per gram of tomato roots by up to 87.1% and 96.0% with isolate BFT 102 in soil without cattle manure. For plants grown in soil with cattle manure, the reductions in the number of galls and of egg masses were of 53.7% (isolate BFT 7) and 65.4% (isolate BFT 71), respectively. *Streptomyces* spp. in soil with or without cattle manure promotes the control of *M. javanica* in tomato plants.

Key-words: *Solanum lycopersicum*, root-knot nematode, actinobacterias, organic manure, root colonization.

INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, estão amplamente distribuídos em todas as regiões do Brasil. A meloidoginose está entre os principais problemas fitossanitários em diversas culturas de importância econômica, entre elas, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (FERRAZ et al., 2010).

As perdas na produção das culturas devido ao ataque de nematoides podem variar de leves a severas. Em âmbito mundial, são estimadas perdas anuais causadas por estes patógenos em todas as culturas em torno de 80 bilhões de dólares (AGRIOS, 2004).

O cultivo em áreas com altas infestações de *Meloidogyne* spp. pode levar à morte de mudas transplantadas para o campo e afetar negativamente a produção das plantas sobreviventes (CANTU et al., 2009).

No manejo destes fitoparasitas, frequentemente se recorre ao controle químico. Entretanto, o uso de nematicidas tem sido cada vez mais limitado por causa da alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento e baixa eficácia de controle depois de repetidas aplicações (DONG e HANG, 2006). A adoção de métodos sustentáveis para o manejo de fitonematoides vem se destacando em todo o mundo, a exemplo do controle biológico e da incorporação de matéria orgânica ao solo (FERRAZ et al., 2010).

Os agentes de controle biológico podem causar alterações na reprodução do patógeno e na sua orientação em direção às raízes da planta hospedeira no solo ou podem causar a sua morte (efeito nematicida) (ARAÚJO et al., 2002). O manejo por métodos biológicos, quando usado de forma correta, não contamina, não desequilibra, não deixa resíduos no meio ambiente, além de ser de fácil aplicação (SOARES, 2006; BETTIOL, 2008).

Dentre os agentes de biocontrole de fitonematoides, destacam-se as actinobactérias. Estas, principalmente as do gênero *Streptomyces*, apresentam papel importante na rizosfera, por beneficiarem o crescimento das plantas, colonizando as raízes e agindo contra fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos, pela produção de antibióticos e de outros metabólitos secundários (RAUPACH e KLOEPPER, 1998; COMPANT et al., 2005; DAMASCENO, 2011).

As actinobactérias são produtoras de enzimas capazes de degradar moléculas complexas, especialmente celulose, lignocelulose, xilanose e lignina e produtoras de outras substâncias biologicamente ativas e com elevado valor comercial como as vitaminas, alcaloides, fatores de crescimento de plantas e enzimas extracelulares (CRAWFORD, 1988; TANAKA e OMURA, 1993; GAVA, 1998; COOMBS e FRANCO, 2003; SOUSA, 2006; DAMASCENO, 2011).

De acordo com Halbrendt e LaMondia (2004), a decomposição da matéria orgânica no solo pode resultar na disponibilização de compostos orgânicos que apresentam efeito inibitório sobre agentes fitopatogênicos e, também, na indução de resistência a fitopatogênicos. Além dos compostos tóxicos produzidos pelo material orgânico em decomposição, o incremento de matéria orgânica no solo funciona como fonte de carbono, energia e nutrientes, estimulando o aumento de certas populações microbianas antagonistas, tais como fungos, bactérias, actinobactérias, algas e nematoides de vida livre (RODRIGUEZ-KÁBANA et al., 1994).

A redução na população de nematoides pelo uso de matéria orgânica envolve múltiplos modos de ação, como o favorecimento da microbiota antagonista ao nematoide, a liberação de fitoquímicos secundários ou outros compostos nematicidas, além da maior capacidade da planta em resistir ao parasitismo, bem como promover a melhoria da estrutura do solo (CHAVARRÍA-CARVAJAL e RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1998; RITZINGER e McSORLEY, 1998; AKHTAR e MALIK, 2000; RITZINGER e FANCELLI, 2006).

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de *Streptomyces* spp. e do esterco bovino no manejo de *M. javanica* em tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos isolados de *Streptomyces* spp.

Foram estudados 10 isolados de *Streptomyces* spp. da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, codificados como BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 106 e PD 3. Estes foram selecionados para o controle de *M. javanica* e para a promoção de crescimento do tomateiro, em casa de vegetação (DAMASCENO, 2011). Estas actinobactérias foram isoladas do resíduo seco de sisal procedentes das

localidades de Baixa do Feijão/Tiquara (BFT) e Pau D'arco (PD), no município de Campo Formoso, Bahia.

Multiplicação das actinobactérias

Na obtenção do inóculo, os 10 isolados de actinobactérias, preservados em glicerol a 20% a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram multiplicados em meio de cultura Czapeck Dox sólido por cinco dias, à temperatura de $28\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foram adicionados 500 mL de água destilada a 300 g de arroz parboilizado em um béquer de dois litros, o qual permaneceu a temperatura ambiente por 1 hora para hidratação do arroz. Após este período, o excesso de água foi removido, utilizando-se uma peneira de 35 mesh e porções de 50 g do arroz hidratado foram colocadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, sendo estes fechados e em seguida, autoclavados a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 55 minutos (SOARES et al., 2007).

Na infestação do arroz esterilizado, foram transferidos 10 discos de 6 mm da cultura dos isolados de *Streptomyces* spp. , tendo sido preparados três frascos para cada isolado de actinobactéria, sendo estes incubados em câmara de crescimento B.O.D., à temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias.

Enriquecimento do solo com actinobactérias

O solo foi coletado em área de pastagem, no *Campus* da UFRB em Cruz das Almas. Este foi misturado com areia (1:1), em seguida, esterilizado a 120°C por 1 hora e 30 minutos durante dois dias consecutivos e foi distribuído em sacos plásticos com capacidade para 100 litros, revestidos com sacos de nylon, colocando-se 30 litros de solo por saco, seguida da incorporação de esterco bovino na dose equivalente a 30 g/vaso, cada vaso contendo 2 litros de solo, correspondendo à dose em campo de 30 t ha^{-1} de esterco bovino. Uma amostra de solo foi coletada para a caracterização química (EMBRAPA, 2009) e apresentou as seguintes características: pH (H_2O) 5,1; Ca^{+2} , $1,3\text{ Cmol/dm}^3$; Mg^{+2} , $0,8\text{ Cmol/dm}^3$; P, 10 mg/dcm^3 ; K, $0,08\text{ Cmol/dm}^3$; SB, $2,23\text{ Cmol/dm}^3$; CTC, $5,09\text{ Cmol/dm}^3$; V, 44%.

Para o enriquecimento do solo, uma suspensão dos isolados de *Streptomyces* spp. foi preparada a partir do arroz colonizado. Utilizou-se a proporção de 20 g de arroz colonizado para 16 L de solo. Fez-se o cálculo de

acordo com a contagem de UFC e a quantidade de arroz colonizado na suspensão, adotando-se como base para padronizar a quantidade de inóculo, o isolado PD 3 que apresentou a maior quantidade de UFC/g arroz colonizado. O arroz colonizado foi transferido para sacos plásticos descartáveis, com capacidade para 1 litro, com 100 mL de água destilada esterilizada para homogeneização da suspensão de inóculo. Após, foi fechado e agitado para permitir o desprendimento das actinobactérias do arroz e, em seguida, esta suspensão foi adicionada ao solo, sendo este agitado para homogeneização do inóculo. Este procedimento foi repetido duas vezes.

No controle, adicionou-se apenas água ao solo. Os sacos contendo o solo foram mantidos em estufa agrícola à temperatura ambiente para incubação por 30 dias, sendo os sacos agitados semanalmente, para homogeneização, periodicamente, adicionou-se água para manter o solo friável.

Quantificação das actinobactérias no solo

Após a incubação, por 30 dias, fez-se a quantificação da população de actinobactérias por meio da técnica da diluição seriada. Amostras de 10 g do substrato foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada e foram agitadas por 20 minutos em agitador orbital. Em seguida, foram realizadas diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada, obtendo-se diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . Fez-se o plaqueamento de 100 μ L das diluições 10^{-2} a 10^{-4} em meio Czapeck Dox sólido, acrescido de 100 μ g/mL de ciclohexamida, para inibição do crescimento de fungos, com três repetições para cada diluição, tendo o inóculo sido espalhado com alça de Drigalski esterilizada por flambagem.

Para o crescimento das actinobactérias, as placas foram incubadas por cinco dias a 28 ± 2 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. As populações de actinobactérias no solo foram estimadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e o cálculo foi feito com base na seguinte fórmula: UFC.g^{-1} substrato seco = $N \times F \times Y$, sendo: N = média do número de colônias das três repetições, F = 10 (fator de correção do plaqueamento de 100 μ L de suspensão por placa para 1 mL de suspensão), Y = fator de diluição da amostra. Na análise estatística, os dados foram transformados em $\log(x + 1)$, em que x corresponde ao número de UFC. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR

(FERREIRA, 2011), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A quantificação da densidade populacional de actinobactérias no substrato foi realizada aos 30 dias após a incubação e repetida após a coleta do experimento.

Controle de *Meloidogyne javanica* com actinobactérias e esterco bovino em tomateiros cultivados em casa de vegetação

Para avaliar o efeito do enriquecimento e incubação do solo com isolados de *Streptomyces* spp. no crescimento do tomateiro, foi conduzido um experimento em casa de vegetação. Após 30 dias de incubação do solo com os 10 isolados selecionados anteriormente, 2 litros desse solo foram transferidos para cada vaso plástico.

Este experimento foi conduzido sob delineamento em blocos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial $10 \times 2 + 2$ (10 isolados de actinobactérias) \times 2 condições de solo (com e sem esterco bovino) + duas testemunhas [sem actinobactérias - SA e sem esterco (testemunha 1) e sem actinobactérias e com esterco - SAE (testemunha 2)], inoculados ou não com 4000 indivíduos de *M. javanica*, com 14 repetições. A parcela experimental foi constituída por uma muda por vaso. Os tratamentos foram: T1 - sem actinobactérias e sem esterco (SA); T2 - sem actinobactérias e com esterco (SAE); T3 - BFT 4; T4 - BFT 7; T5 - BFT 11; T6 - BFT 41; T7 - BFT 71; T8 - BFT 87; T9 - BFT 88; T10 - BFT 102; T11 - BFT 106; T12 - PD 3; T13 - BFT 4 + esterco bovino; T14 - BFT 7 + esterco bovino; T15 - BFT 11 + esterco bovino; T16 - BFT 41 + esterco bovino; T17 - BFT 71 + esterco bovino; T18 - BFT 87 + esterco bovino; T19 - BFT 88 + esterco bovino; T20 - BFT 102 + esterco bovino; T21 - BFT 106 + esterco de bovino; T22 - PD 3 + esterco bovino. O esterco bovino foi curtido por 60 dias antes de ser utilizado.

Sementes de tomateiro cv. 'Santa Cruz Kada' foram semeadas em bandeja contendo substrato Plantmax® e, as mudas foram transplantadas para os vasos, 20 dias após a germinação. Aos 15 dias após o transplante, realizou-se a inoculação com 4000 indivíduos de *M. javanica*. As plantas foram coletadas aos 40 dias após a inoculação, mediu-se a altura com uma régua milimetrada e o diâmetro do caule, com paquímetro digital. A parte aérea foi separada das raízes das plantas, estas foram lavadas em água e, em seguida, colocadas para secar

em estufa com ventilação forçada a 65 °C, até atingir massa constante. Após a secagem em estufa, foi determinada a massa da matéria seca da parte aérea.

Realizou-se um ensaio preliminar com corantes usados na culinária alimentícia (anilina) visando avaliar a coloração de massas de ovos de *M. javanica*. Utilizou-se os seguintes tratamentos: 1) Ponceau 4R e vermelho 40 (Mix Coralim® vermelho morango); 2) Ponceau 4R e azul brilhante (Mix Coralim® roxo batata); 3) Eritrozina, bordeaux e azul brilhante (Mix Coralim® Pink); 4) Tartrazina e amarelo crepúsculo (Mix Coralim® amarelo gema) e 5) Tartrazina e azul brilhante FCF (Mix Coralim® verde hortelã) nas concentrações de 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0% e 5,0% de cada produto comercial. O corante artificial Ponceau 4R e vermelho 40 (Mix Coralim® vermelho morango) a 1% coloriu eficazmente as massas de ovos de *M. javanica*.

Após a lavagem, o sistema radicular foi colorido com solução a 1%, do corante artificial Ponceau 4R e vermelho 40 (Mix Coralim® vermelho morango). As raízes foram colocadas em béquer de 500 mL contendo a solução corante e deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente. As raízes foram retiradas da solução, deixadas em béquer contendo água por mais 10 minutos e transferidas para papel toalha por 15 minutos, para remover o excesso de água. Posteriormente, mediu-se a massa da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de galhas e de massas de ovos. As raízes foram colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65 °C, até atingir massa constante, para determinação da massa seca das raízes. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Crescimento de actinobactérias em diferentes valores de pH

Na avaliação do crescimento dos isolados de actinobactérias, em diferentes valores de pH no meio de cultura Czapeck Dox sólido, foi instalado um bioensaio em delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial, 10 x 7 + 1 (dez isolados de actinobactérias e sete valores de pH) e uma testemunha, com três repetições.

Discos de 6 mm das culturas de actinobactérias foram transferidos para o meio de cultura sólido Czapeck Dox, com os valores de pH ajustados em 4,0; 5,0;

6,0; 7,0 8,0; 9,0 e 10,0. Como testemunha, os isolados foram cultivados no mesmo meio com pH ajustado para 7,2. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 28 °C durante sete dias e o crescimento das actinobactérias foi observado diariamente. Para ajuste dos valores de pH abaixo de 7,2 (testemunha) foi adicionado HCl (1,0%) e para os valores acima de 7,2 foi adicionado NaOH (10,0%).

Colonização radicular *in vitro* de plântulas de tomateiro pelos isolados de actinobactérias

Para avaliar a capacidade, *in vitro*, dos isolados de actinobactérias em colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro, foi montado um bioensaio em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 10 isolados de actinobactérias, uma testemunha e cinco repetições. Inicialmente, as sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram desinfestadas pela imersão nas soluções de álcool 70,0% (2 minutos) e hipoclorito de sódio 1,0% (1 minuto), seguida de três lavagens consecutivas em água destilada. Após desinfestadas, as sementes foram secas em papel de filtro esterilizado e transferidas, com uma pinça esterilizada, para tubos de ensaio (três sementes/tubo), que continham meio ágar-água a 0,6%.

Os tubos foram mantidos em câmara de crescimento sem luz, à temperatura de 30 °C, até a emissão da radícula (período de três a quatro dias). Posteriormente, com uma alça de platina, foram inoculados, próximos à radícula, os esporos das actinobactérias cultivadas por 8 a 10 dias em placa de Petri com meio de cultura sólido Czapeck Dox. Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura e luminosidade ambiente. Diariamente, cada tubo foi colocado sobre um fundo com luz fluorescente para observar a colonização radicular. Uma camada de aspecto pulverulento, contrastando com o meio ágar-água ao longo do sistema radicular do tomateiro em formação, indicava o crescimento das actinobactérias ao redor da raiz, registrado como positivo (+).

Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias

A produção das enzimas (celulase, xilanase, quitinase e lipase), a solubilização de fosfato de cálcio e a produção de ácido indolacético foram determinadas por Damasceno (2011).

Produção de amilase

A produção de amilase foi determinada conforme descrito por Coon et al. (1957). Os isolados de actinobactérias foram multiplicados no meio de cultura ágar amido, constituído de 0,2% de amido solúvel. Posteriormente, as culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., a 28 ± 2 °C por 10 dias. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 10 mL de solução de lugol às placas. A produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, devido à hidrólise do amido.

Produção de catalase

Na determinação da produção da enzima catalase, os isolados de actinobactérias foram multiplicados em meio de cultura NYDA (MARIANO et al., 2000) e as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento, tipo B.O.D., 28 ± 2 °C por 10 dias. Após esse período, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. A reação positiva foi evidenciada pela formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio (MARIANO et al., 2000). Em ambos os ensaios, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, constando de 10 tratamentos e três repetições.

Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias

Os isolados de actinobactérias foram caracterizados morfológicamente, seguindo a metodologia proposta pelo Projeto Internacional de *Streptomyces* (ISP) (SHIRLING e GOTTLIEB 1966; 1972; WILLIAMS et al. 1983). Os isolados foram cultivados em meios de cultura sólidos à base de extrato de malte, extrato de levedura e ágar (ISP-2) (PRIDHAM et al., 1957), de farinha de aveia e ágar (ISP-3) (KUSTER, 1959), de sais inorgânicos, amido e ágar (ISP-4) (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966), com três estrias por placa. Foram inseridas no meio, em cada placa, de forma perpendicular e próximo às estrias, três lamínulas estéreis inclinadas. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D., por 8 dias, a 28 ± 2 °C. Após esse período, as lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça esterilizada e colocadas em lâminas microscópicas contendo uma gota de solução de lactofenol com azul de metila. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico, para observação do formato e tamanho das cadeias de esporos e presença de micélio aéreo. Foi registrada também, a coloração das colônias e produção de pigmentos no meio

de cultura pelos isolados de actinobactérias. O delineamento foi inteiramente ao acaso, constando de 10 tratamentos e três repetições.

Identificação molecular dos isolados de actinobactérias

Os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio de cultura líquido, à base de extrato de malte e extrato levedura (ISP-2), a 28 ° C por oito dias. Posteriormente, o DNA genômico dos isolados foi extraído, seguindo o protocolo com o reagente CTAB (WILSON, 1987).

O gene ribossomal 16S rDNA foi amplificado com o par de primers fD1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e rP1 (5' – ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3') (WEISBURG et al., 1991). O produto amplificado, de aproximadamente 1400 pb, foi sequenciado com o par de primers original, o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e o sequenciador capilar ABI 3500 XL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécies tipo depositadas no Ribosomal Database Project, release 11 (<http://rdp.cme.msu.edu>) (COLE et al, 2014) e de espécies ainda não identificadas, porém com alta similaridade, presentes no GenBank. A árvore filogenética foi construída por meio do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), empregando-se o método de Maximum Likelihood com 500 replicações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de *Meloidogyne javanica* com actinobactérias e esterco bovino em tomateiro cultivado em casa de vegetação

A análise de variância para os dados de crescimento revelou interação tripla significativa entre solo, inóculo e os tratamentos com os isolados de actinobactérias no solo sem inoculação de nematoides, para as variáveis altura das plantas, diâmetro caulinar, massa das matérias secas da parte aérea e das raízes (Tabelas 1 e 2).

Para a altura do tomateiro, nos tratamentos sem inoculação com os nematoides, houve interação entre o solo (com ou sem esterco) incubado e infestado com os isolados BFT 7, BFT 41, BFT 106 e PD 3, com incrementos de 46%, 75%, 70% e 86%, respectivamente, na altura das plantas cultivadas no solo incubado com esterco em relação àquelas produzidas em solo sem esterco.

Porém, na avaliação dos tratamentos, isoladamente, observou-se que, no solo sem esterco, não houve diferença entre os tratamentos com os isolados de actinobactérias, diferindo somente da testemunha, com aumento na altura, variando de 27% (BFT 41) até 60% (BFT 11) (Tabela 1). Nos tratamentos com esterco, houve diferença significativa, com incrementos de até 72%, 49%, 49% e 34% para o solo enriquecido e incubado com PD 3, BFT 41, BFT 106 e BFT 7, respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 1).

Para o diâmetro caulinar, somente a testemunha (SA) e o isolado BFT 106 não diferiram em relação ao solo sem ou com esterco. Entretanto, avaliando de forma isolada, não houve diferença entre os tratamentos com as actinobactérias e as testemunhas (Tabela 1).

Quanto à massa da matéria seca da parte aérea, houve interação significativa entre o solo sem esterco e com esterco, porém, não houve diferença entre os isolados de actinobactérias e as testemunhas. Vale ressaltar que, embora, não tenha sido observada diferença entre os tratamentos, no solo com esterco, a massa seca da parte aérea foi superior em todos os tratamentos. Na testemunha (SAE), foram observados incrementos de 203% em relação à testemunha constituída pelo solo sem esterco.

Tabela 1. Altura das plantas (cm), diâmetro caulinar (cm), massas das matérias secas da parte aérea (g) (MSPA) e das raízes (g) (MSR) de tomateiro produzidas em solo com (CE) e sem esterco bovino (SE), enriquecidos com actinobactérias e sem inoculação com nematoides.

Tratamento	Sem nematoides							
	Altura (cm)		Diâmetro (cm)		MSPA (g)		MSR (g)	
	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE
Testemunha	22,4 Bb	33,2 Ac	0,70 Aa	0,80 Aa	1,34 Ba	4,06 Aa	0,38 Bb	1,23 Ab
BFT 4	33,6 Aa	33,2 Ac	0,64 Ba	0,82 Aa	1,48 Ba	3,77 Aa	0,62 Ba	1,28 Ab
BFT 7	30,6 Ba	44,6 Ab	0,56 Ba	0,86 Aa	0,95 Ba	3,87 Aa	0,36 Bb	1,89 Aa
BFT 11	35,8 Aa	36,8 Ac	0,54 Ba	0,78 Aa	2,20 Ba	3,56 Aa	0,52 Ba	1,48 Ab
BFT 41	28,4 Ba	49,6 Ab	0,52 Ba	0,66 Aa	1,46 Ba	4,23 Aa	0,57 Ba	0,71 Ac
BFT 71	34,6 Aa	33,4 Ac	0,64 Ba	0,86 Aa	1,62 Ba	3,98 Aa	0,49 Ba	1,22 Ab
BFT 87	32,6 Aa	32,2 Ac	0,56 Ba	0,86 Aa	0,90 Ba	4,27 Aa	0,16 Bb	1,17 Ab
BFT 88	30,6 Aa	34,4 Ac	0,60 Ba	0,88 Aa	0,91 Ba	4,11 Aa	0,17 Bb	1,18 Ab
BFT 102	32,0 Aa	34,8 Ac	0,58 Ba	0,96 Aa	1,04 Ba	4,44 Aa	0,18 Bb	0,95 Ac
BFT 106	29,0 Ba	49,4 Ab	0,59 Aa	0,64 Aa	1,08 Ba	2,92 Aa	0,23 Bb	0,51 Ac
PD 3	30,8 Ba	57,2 Aa	0,56 Ba	0,70 Aa	1,34 Ba	4,50 Aa	0,30 Bb	0,91 Ac
CV(%)	13,5		48,2		29,4		49,2	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do mesmo isolado de actinobactéria sem inoculação com nematoides. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactérias nos substratos sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade.

Para a massa da matéria seca das raízes, houve interação entre os tratamentos, com melhores resultados para aqueles com as actinobactérias e com esterco bovino. De forma geral, as massas das matérias secas das raízes das plantas cultivadas no solo com esterco foram superiores às daquelas do solo sem esterco. Quando avaliada a massa seca das raízes nos tratamentos, de forma isolada, observou-se que os isolados BFT 4, BFT 41, BFT 11 e BFT 71 promoveram incrementos de 63%, 50%, 37% e 29% em relação ao tratamento testemunha (SA) no solo sem esterco. No solo com esterco, o melhor resultado foi obtido com o enriquecimento do substrato com o isolado BFT 7 que promoveu incremento de 54% em relação à testemunha (SAE) (Tabela 1).

Houve diferença significativa para as variáveis de crescimento do tomateiro cultivados em solo com ou sem esterco e inoculados com os nematoides (Tabela 2).

Na altura, não houve interação significativa nas plantas cultivadas nos solos sem ou com esterco e incubados com os isolados BFT 11, BFT 87, BFT 88 e BFT 102. Quando avaliado o solo de forma isolada, observou-se que, no solo apenas com as actinobactérias, houve incremento na altura das plantas de 57%, 56%, 51%, 50%, 42%, 36% e 26%, respectivamente, nos tratamentos com os isolados BFT 102, PD 3, BFT 87, BFT 88, BFT 7, BFT 71, BFT 11, em relação ao tratamento testemunha (SA) (Tabela 2).

No solo com a incorporação do esterco, houve aumento na altura das plantas, nos tratamentos com os isolados PD 3, BFT 106, BFT 41 e BFT 7, com incrementos respectivos de 86%, 80%, 58% e 39% em relação à testemunha. Entretanto, nem todos os isolados que promoveram incrementos no solo sem esterco demonstraram essa capacidade naquele com esterco. No diâmetro do caule, independente do tipo de solo não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Altura das plantas (cm), diâmetro caulinar (cm), massas das matérias secas da parte aérea (g) (MSPA) e das raízes (g) (MSR) de tomateiro, produzidas em solos com (CE) ou sem esterco bovino (SE), enriquecidos com actinobactérias e inoculadas com nematoides.

Isolado	Com nematoides							
	Altura (cm)		Diâmetro (cm)		MSPA (g)		MSR (g)	
	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE
Testemunha	21,2 Bb	30,4 Ac	0,66 Ba	0,84 Aa	1,23 Ba	3,73 Ab	0,34 Ba	0,89 Ab
BFT 4	25,2 Bb	34,6 Ac	0,48 Ba	0,86 Aa	1,20 Ba	2,73 Ab	0,30 Ba	0,58 Ab
BFT 7	30,0 Ba	42,2 Ab	0,58 Ba	0,80 Aa	0,73 Ba	4,18 Aa	0,14 Ba	1,45 Aa
BFT 11	26,8 Ab	29,8 Ac	0,49 Ba	0,88 Aa	0,78 Ba	3,72 Ab	0,36 Ba	1,34 Aa
BFT 41	24,8 Bb	48,2 Ab	0,48 Ba	0,66 Aa	0,66 Ba	3,62 Ab	0,28 Ba	0,94 Ab
BFT 71	28,8 Ba	31,6 Ac	0,42 Ba	0,82 Aa	0,82 Ba	3,79 Ab	0,32 Ba	0,90 Ab
BFT 87	32,0 Aa	33,0 Ac	0,60 Ba	0,87 Aa	0,95 Ba	3,64 Ab	0,21 Ba	1,22 Aa
BFT 88	31,8 Aa	39,4 Ac	0,62 Ba	0,86 Aa	0,99 Ba	4,33 Aa	0,18 Ba	1,32 Aa
BFT 102	33,2 Aa	31,4 Ac	0,70 Ba	0,90 Aa	1,16 Ba	4,48 Aa	0,19 Ba	1,26 Aa
BFT 106	27,6 Bb	54,8 Aa	0,60 Aa	0,64 Aa	0,89 Ba	4,20 Aa	0,14 Ba	0,72 Ab
PD3	33,0 Ba	56,6 Aa	0,58 Aa	0,68 Aa	1,24 Ba	4,83 Aa	0,15 Ba	1,11 Aa
CV(%)	18,5		52,2		32,4		47,9	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do mesmo isolado de actinobactéria sem inoculação com nematoides. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactérias nos substratos sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade.

Houve interação significativa nas massas das matérias secas da parte aérea e das raízes entre os tratamentos com e sem esterco, sendo que os melhores resultados foram obtidos no solo com esterco. Quando os tratamentos foram avaliados de forma isolada, observou-se que o enriquecimento do solo com as actinobactérias não promoveram incrementos na ausência do esterco, para ambas as variáveis. Houve diferença significativa entre os tratamentos no solo com esterco para as duas variáveis analisadas (Tabela 2), indicando que mesmo na presença dos nematoides, houve desenvolvimento das plantas.

O enriquecimento do solo com os isolados de actinobactérias, seguida da incorporação do esterco, promoveu acúmulo de 29%, 20%, 16%, 13% e 12% na biomassa seca da parte aérea com os isolados PD 3, BFT 102, BFT 88, BFT 106 e BFT 7, respectivamente, em relação ao tratamento somente com o esterco (SAE). Na massa da matéria seca das raízes, os tratamentos com os isolados BFT 7, BFT 11, BFT 88, BFT 102, BFT 87 e PD 3 promoveram aumento de 63%, 51%, 48%, 42%, 37% e 25%, respectivamente, quando comparados com o tratamento testemunha (SAE) (Tabela 2).

Observando as raízes das plantas inoculadas com nematoides no solo com esterco, verificou-se que em alguns tratamentos houve aumento na massa seca em relação aqueles tratamentos sem nematoides. O aumento da massa radicular

na presença dos nematoides pode ser explicado pela maior disponibilização de nutrientes no substrato para serem absorvidos pelas plantas, favorecendo a formação de raízes secundárias, o que contribuiu para um melhor desenvolvimento do sistema radicular e uma maior infecção e formação de galhas (DAMASCENO, 2011). Além disso, alguns autores sugerem que esse aumento seria a consequência de efeito combinado da emissão de novas raízes secundárias, nos locais de infecção do nematoide (HUTANGURA et al., 1999) e também pela formação de galhas (CARNEIRO et al., 1999; CARNEIRO, 2000; ABRÃO e MAZZAFERA, 2001).

Çakmakçi et al. (2005) utilizaram rizobactérias em dois tipos de solos orgânicos na promoção de crescimento de plantas de beterraba. Segundo os autores, a promoção de crescimento das plantas pelas rizobactérias e o aumento da folhagem foram fortemente dependentes da matéria orgânica contida no solo, pois os compostos orgânicos podem ser usados como fonte de energia e carbono pelas bactérias. De acordo com Kiehl (1985), o esterco bovino é um fertilizante orgânico capaz de fornecer nutrientes para as plantas e, assim, estimular o crescimento vegetativo de culturas agrícolas. A ação do esterco bovino como substrato se pode explicar o aumento da biomassa das plantas sem o enriquecimento do solo com as actinobactérias, quando inoculadas ou não com nematoides.

Verificou-se interação significativa entre solo sem esterco ou com esterco para o número de galhas e massas de ovos por planta e por grama de raízes. O número de galhas por planta foi menor no solo sem esterco, infestado com os isolados BFT 102, BFT 106 e PD 3 quando comparados com o solo com esterco (Tabela 3).

Ao avaliar os tratamentos isoladamente, observou-se que raízes dos tomateiros com os isolados BFT 102, BFT 106, BFT 87, PD 3, BFT 88, BFT 7 e cultivados no solo sem esterco apresentaram redução de 85%, 64%, 50%, 49%, 43% e 24%, respectivamente, no número de galhas por planta quando comparados com a testemunha (SA). Nas raízes de plantas cultivadas no solo com esterco e enriquecidos com os isolados BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 71, BFT 87, BFT 88 e BFT 102, a redução no número de galhas variou de 26% (BFT 4) até 55% (BFT 11) em relação ao tratamento testemunha (SAE) (Tabela 3).

No número de galhas por grama de raízes, exceto, para os tratamentos com os isolados BFT 102, BFT 106 e PD 3, os demais diferiram estatisticamente entre os solos (com e sem esterco), com menor número de galhas no solo com esterco. Quando avaliados os tratamentos entre si, verificou-se houve redução significativa no número de galhas por grama de raízes no solo sem esterco, enriquecido com a maioria dos isolados de actinobactérias, com redução de até 87% (BFT 102). Para o solo incorporado com o esterco, essa redução variou de 32% (BFT 87) até 54% (BFT 7) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de galhas (NG) e de massas de ovos (MO) de *Meloidogyne javanica*, por planta e por grama de raízes, em tomateiros crescidos em solo com esterco (CE) e sem esterco (SE) e enriquecidos com actinobactérias.

Tratamentos	Dano nas raízes do tomateiro							
	NG/planta		NG/g raízes		MO/planta		MO/g raízes	
	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE
Testemunha	130,4 Aa	146,0 Aa	39,2 Aa	10,6 Ba	118,2 Aa	95,5 Aa	36,8 Aa	7,8 Bb
BFT 4	146,5 Aa	108,0 Ab	32,0 Aa	10,7 Ba	26,2 Bb	73,2 Ab	5,4 Ab	7,1 Ab
BFT 7	95,2 Ab	71,2 Ab	25,3 Ab	4,9 Bb	17,8 Bb	71,2 Ab	4,7 Ab	4,8 Ac
BFT 11	121,8 Aa	65,0 Bb	23,7 Ab	6,0 Bb	30,6 Ab	40,2 A b	6,3 Ab	4,3 Ac
BFT 41	197,2 Aa	141,2 Aa	30,1 Aa	9,9 Ba	65,4 Aa	97,2 Aa	10,2 Ab	6,3 Ab
BFT 71	245,2 Aa	78,0 Bb	48,2 Aa	6,4 Bb	73,0 Aa	42,8 Ab	16,2 Ab	2,7 Bc
BFT 87	65,4 Ab	101,6 Ab	18,7 Ab	7,2 Bb	22,8 Ab	51,6 Ab	6,4 Ab	3,6 Ac
BFT 88	74,2 Ab	80,2 Ab	20,5 Ab	5,8 Bb	21,4 Ab	53,0 Ab	5,9 Ab	3,9 Ac
BFT 102	20,2 Bb	102,6 Ab	5,04 Ac	6,4 Ab	5,8 Bb	58,4 Ab	1,5 Ab	3,7 Ac
BFT 106	47,4 Bb	151,6 Aa	11,6 Ac	20,8 Aa	12,8 Bb	136,4 Aa	3,1 Bb	17,2 Aa
PD 3	65,5 Bb	202,2 Aa	17,5 Ab	15,2 Aa	17,8 Bb	170,0 Aa	5,5 Bb	13,0 Aa
CV(%)	31,1		27,4		34,3		32,0	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do mesmo isolado de actinobactéria em tomateiros inoculados com nematoides. Letras minúsculas na coluna comparam o efeito dos isolados de actinobactérias em tomateiros inoculados com nematoides. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott -Knott a 5% de probabilidade.

Redução significativa na massa de ovos por planta foi observada com o enriquecimento do solo com os isolados de actinobactérias e sem esterco, com exceção, dos isolados BFT 41 e BFT 71 que não diferiram da testemunha (SA). A redução variou de 74% a 95% no solo infestado com os isolados BFT 11 e BFT 102, respectivamente, quando comparados com a testemunha. No solo com esterco, a redução variou de 23% (BFT 4) a 58% (BFT 11) em relação ao tratamento testemunha (SAE) (Tabela 3).

O enriquecimento do solo sem esterco, com todos os isolados de actinobactérias reduziu a massa de ovos por grama de raízes de forma significativa, variando de 56% (BFT 71) a 96% (BFT 102). Houve redução de 65%, 54%, 53%, 50%, 45% e 38%, respectivamente, no solo com esterco e com os isolados BFT 71, BFT 87, BFT 102, BFT 88, BFT 11 e BFT 7 de actinobactérias (Tabela 3).

Destaca-se que os resultados de número de galhas e massas de ovos por grama de raízes, nas duas testemunhas, indicaram que substâncias presentes no esterco bovino, a exemplo, de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, provavelmente, promoveram o efeito nematicida (SANTOS et al., 2013). Este índice foi inferior no solo com esterco em relação à testemunha do solo sem esterco, com redução de 73% e 79%, no número de galhas e de massas de ovos por grama de raízes, respectivamente.

Estes mesmos isolados foram utilizados no controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro cultivadas em substrato Vivatto Slim®, sendo que os isolados BFT 4, BFT 7, BFT 41, BFT 71, BFT 88, BFT 106 e PD 3 promoveram redução no número de galhas e de massa de ovos por grama de raízes acima de 50% (DAMASCENO e SOARES, 2013).

Dentre os micro-organismos presentes no solo, as actinobactérias são os principais responsáveis pela mineralização da matéria orgânica (KIEHL, 2004), pois produzem compostos bioativos e enzimas (MALHERBE e CLOETE, 2002) que atuam na decomposição de macromoléculas orgânicas recalcitrantes tais como celulose, hemicelulose e lignina (KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004; REDDY e YANG, 2005). Estes isolados de actinobactérias já demonstraram, sob condições *in vitro*, a capacidade de produção da enzima celulase (DAMASCENO, 2011).

A decomposição do esterco incorporado ao solo enriquecido com as actinobactérias favorece ainda mais a proliferação de outros inimigos naturais, podendo promover a adição de nutrientes e a melhoria da estrutura do solo, além de possuírem substâncias com efeito nematicida (BADRA et al., 1979; GONZÁLES e CANTO-SÁENZ, 1993).

A incorporação do esterco bovino favoreceu a decomposição da matéria orgânica pelos isolados de actinobactérias. Em consequência, reduziu os danos devidos aos nematoides, pois ao avaliar a massa da matéria seca das raízes,

observou-se que nos tratamentos somente com actinobactérias (sem o esterco), em alguns casos, a biomassa seca foi inferior ao tratamento testemunha 1 (SA), não havendo diferença entre os tratamentos (Tabela 2). A incorporação de matéria orgânica ao solo, além do próprio potencial nematicida de alguns resíduos (AKHTAR e MALIK, 2000; FERRAZ et al. 2010; LOPES et al., 2011), pode contribuir para o estabelecimento de agentes de controle biológico.

Cannayane e Rajendran (2001) relataram sobre o controle de fitonematoides pela associação de agentes de controle biológico e matéria orgânica. Quando se adiciona matéria orgânica no substrato, dependendo do tipo de composto, durante o seu processo de decomposição, podem ser produzidos e liberados, no solo, compostos que são tóxicos aos nematoides, promovendo efeito nematicida. O mecanismo de ação da matéria orgânica na supressão de fitonematoides tem sido atribuído, muitas vezes, à melhoria da estrutura dos solos, incluindo mudanças no pH, umidade e nas propriedades químicas e físicas, aumentando a capacidade de retenção de água e melhorando a nutrição da planta por meio da liberação de nutrientes (AKHTAR e MALIK, 2000; FERRAZ et al. 2010).

O potencial da utilização de adubos orgânicos e micro-organismos antagonistas, como as actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*, no controle de fitonematoides em culturas de interesse econômico, foram relatados por diversos autores (JONATHAN et al., 2000; KAZUYOSHI et al., 2002; COIMBRA et al., 2005; COIMBRA et al., 2006; ARDUIM, 2006; SOUSA et al., 2006; PAIXÃO, 2008; SOUSA et al., 2009; COIMBRA e CAMPOS, 2010; DAMASCENO, 2011; SANTOS, 2013).

Machado et al. (2013) estudaram o efeito da aplicação de *Pochonia chlamydosporia* e esterco bovino no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro e verificaram que a incorporação, ao solo, de esterco bovino juntamente com o fungo, aumentou a biomassa da parte aérea e das raízes de tomateiros e reduziu o número de galhas e de ovos de *M. javanica*. Machado et al. (2010), avaliaram o efeito da aplicação de *Paecilomyces lilacinus* e esterco bovino na redução populacional de *M. incognita* em tomateiro e alface e concluíram que a ação supressora da combinação fungo-esterco ocorreu, principalmente, por meio do esterco, uma vez que a aplicação isolada do fungo não reduziu o dano.

Siddiqui et al. (2001) testaram dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* em combinação com a adição de esterco bovino e fertilizante inorgânico, visando

ao manejo de *M. incognita* em tomateiro. Segundo os autores o uso da matéria orgânica combinada com *P. fluorescens* promoveu maior redução no número de galhas e maior crescimento das plantas do que a aplicação do fertilizante inorgânico. Em trabalho desenvolvido por Gomes et al. (2002), estudando a influência do esterco bovino no substrato sobre a multiplicação de *Pasteuria penetrans* em tomateiro inoculado com *M. javanica*, os autores verificaram que os menores índices de galhas foram encontrados nos substratos que continham esterco.

Ficou constatado, neste trabalho, que o enriquecimento e incubação do solo com os isolados de actinobactérias e com a adição do esterco bovino têm efeito benéfico no crescimento do tomateiro e na redução dos danos causados pelo nematoide-das-galhas. Durante o período de incubação, as actinobactérias colonizaram o solo e podem ter acelerado o processo de mineralização dos nutrientes, disponibilizando-os para as plantas.

Quantificação das actinobactérias no solo

A quantificação de todos os isolados de actinobactérias, aos 30 dias após a incubação e após a coleta dos tomateiros, revelou densidade populacional superior aos tratamentos testemunhas (SA e SAE), conforme apresentado na Tabela 4.

No solo enriquecido somente com actinobactérias, a população variou de $2,66 \times 10^4$ a $2,88 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de solo, após os 30 dias de incubação e de $1,33 \times 10^4$ a $2,92 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de solo, após a coleta das plantas (Tabela 4). Observou-se que o tratamento testemunha (SA) apresentou uma população muito baixa de actinobactérias, mesmo após a esterilização do solo. Provavelmente, sejam actinobactérias nativas, tolerantes a temperaturas elevadas (Tabela 4). Houve aumento na densidade populacional com a maioria dos isolados de actinobactérias no solo sem esterco, após a coleta do experimento, quando comparados com a densidade populacional aos 30 dias de incubação

No solo enriquecido com actinobactérias e com a aplicação do esterco bovino, a população variou entre $4,23 \times 10^4$ e $2,95 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ de solo, antes do plantio e após a coleta das plantas (Tabela 4), respectivamente. Para o solo com os isolados de actinobactérias BFT 11 e BFT 106, a incorporação do esterco não

favoreceu a densidade populacional; pelo contrário, houve redução na população final de actinobactérias após a coleta das plantas (Tabela 4).

Tabela 4. Densidade populacional de actinobactérias em solo com esterco (CE) e sem esterco (SE) aos 30 dias após incubação e após a coleta do tomateiro.

Tratamentos	Antes do plantio		Após a coleta das plantas	
	SE	CE	SE	CE
Testemunha	2,66 x 10 ⁴ Bc	6,20 x 10 ⁴ Ac	1,33 x 10 ⁴ Ac	1,50 x 10 ⁴ Ac
BFT 4	1,13 x 10 ⁵ Ab	5,53 x 10 ⁴ Bc	2,37 x 10 ⁵ Aa	1,10 x 10 ⁵ Bc
BFT 7	1,65 x 10 ⁵ Ab	1,02 x 10 ⁵ Ac	2,92 x 10 ⁵ Aa	2,38 x 10 ⁵ Ab
BFT 11	2,51 x 10 ⁵ Aa	1,80 x 10 ⁵ Ab	2,35 x 10 ⁵ Aa	9,06 x 10 ⁴ Bc
BFT 41	9,96 x 10 ⁴ Bb	1,56 x 10 ⁵ Ab	1,70 x 10 ⁵ Aa	2,05 x 10 ⁵ Ab
BFT 71	1,30 x 10 ⁵ Ab	9,80 x 10 ⁴ Bc	2,25 x 10 ⁵ Aa	7,06 x 10 ⁴ Bc
BFT 87	1,49 x 10 ⁵ Ab	4,23 x 10 ⁴ Bc	1,87 x 10 ⁵ Ab	5,56 x 10 ⁴ Bc
BFT 88	2,50 x 10 ⁵ Aa	2,32 x 10 ⁵ Aa	1,79 x 10 ⁵ Ba	2,80 x 10 ⁵ Ab
BFT 102	2,88 x 10 ⁵ Aa	2,95 x 10 ⁵ Aa	9,30 x 10 ⁴ Bb	3,66 x 10 ⁵ Aa
BFT 106	1,17 x 10 ⁵ Ab	1,70 x 10 ⁵ Ab	1,44 x 10 ⁵ Ab	6,86 x 10 ⁴ Bc
PD 3	1,67 x 10 ⁵ Ab	1,73 x 10 ⁵ Ab	1,70 x 10 ⁵ Aa	1,24 x 10 ⁵ Ac
CV (%)	14,5		16,3	

Letras maiúsculas na linha comparam o efeito do período de incubação (aos 30 dias antes do plantio) para o mesmo isolado de actinobactéria. Letras minúsculas na coluna comparam os isolados de actinobactérias entre si. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Damasceno (2011), trabalhando com os mesmos isolados em três experimentos e utilizando substrato comercial, verificou variações na densidade populacional dos isolados. Segundo o autor, provavelmente isto ocorreu devido a fatores como umidade e temperatura que não foram controlados, uma vez que outros fatores como substrato, espécie vegetal e isolado foram os mesmos entre os experimentos. Ainda, de acordo com o mesmo autor, o crescimento depende do isolado de actinobactéria e da capacidade deste em utilizar os nutrientes do solo e crescer nessas condições de cultivo. A colonização do solo pelos isolados de actinobactérias é importante, pois propicia a competição por nicho e o seu estabelecimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal.

Outros autores haviam encontrado resultados semelhantes em estudos anteriores com isolados de actinobactérias na cultura do tomateiro (LIMA, 2003; SOUSA et al., 2009a; SOARES et al., 2010; DAMASCENO e SOARES, 2013), do eucalipto (MAFIA et al., 2005), do cacau (BARRETO, 2007), do girassol e do pinhão-manso (BRITO, 2010) e também demonstraram que estes micro-

organismos proporcionaram incrementos significativos no crescimento destas culturas.

O enriquecimento do solo antes do plantio pode promover a estabilização da comunidade microbiana, permitindo a multiplicação das actinobactérias, por exemplo. Estes isolados de actinobactérias possuem competência rizosférica, ou seja, têm a capacidade de colonizar o sistema radicular e de sobreviver no solo ou rizosfera, na presença da microbiota nativa (COMPANT et al., 2005).

Possivelmente, tenha ocorrido a mineralização de nutrientes, especialmente daqueles presentes no esterco que foi incorporado ao solo, por meio da ação das actinobactérias que são consideradas importantes degradadores primários. As actinobactérias são micro-organismos envolvidos em processos de ciclagem da matéria orgânica (MIAO e DAVIES, 2010), em decorrência da produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, principalmente os antibióticos (VENTURA et al., 2007) e enzimas (MALHERBE e CLOETE, 2002) que atuam na decomposição de macromoléculas orgânicas recalcitrantes tais como celulose, hemicelulose e lignina (KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004; REDDY e YANG, 2005). Os metabólitos produzidos por estes micro-organismos podem causar a imobilidade e/ou mortalidade dos nematoides, antes da sua penetração nas raízes, reduzindo a infectividade das plantas (SOUSA, 2006).

Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Sousa (2006), indicando que as actinobactérias colonizaram o substrato, demonstrando que o período de incubação do solo proporcionou tempo hábil para que as actinobactérias, que possuem elevada capacidade de degradação de moléculas complexas, pudessem atuar na decomposição das substâncias orgânicas, promovendo a mineralização da matéria orgânica presente no solo.

A utilização desses micro-organismos constitui-se numa alternativa ecológica aos agroquímicos, além de ser uma estratégia de controle com significativa eficiência contra patógenos do solo, para os quais as medidas de controle são restritas. Assim, os resultados destes trabalhos demonstraram que estes isolados de actinobactérias têm grande potencial para a promoção de crescimento de plantas e biocontrole de *M. javanica*.

Crescimento de actinobactérias em diferentes valores de pH

Os isolados cresceram em todos os valores de pH, tomando toda a placa aos cinco dias após a incubação (Tabela 5). Por meio destes resultados, foi possível verificar que os isolados são adaptados a diferentes valores de pH, os quais podem sobreviver em solos ácidos ou alcalinos. A maioria das actinobactérias isoladas de solo rizosférico e não-rizosférico crescem na faixa de pH que varia entre 6,5 a 8,0 (GAVA, 1998). Segundo Araújo (1998), as actinobactérias crescem em solos de pH neutro e alcalino, embora muitas cresçam em solos ácidos.

Sousa (2006) trabalhou com isolados de actinobactérias na faixa de pH de 5,0 a 7,0 e observou que os isolados cresceram em todos os valores de pH. Entretanto, apresentaram melhor crescimento na faixa de pH entre 6,5 a 7,0. Este mesmo autor observou que alguns isolados de actinobactérias tiveram bom desenvolvimento em pH ácido, sugerindo que os isolados utilizados estavam adaptados às condições ambientais, o que lhes conferiam boa capacidade de competição e sobrevivência em solos ácidos.

Tabela 5. Crescimento dos isolados de actinobactérias em meio de cultura Czapeck Dox sólido com diferentes valores de pH.

Isolados	pH						
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
BFT 4	+	+	+	+	+	+	+
BFT 7	+	+	+	+	+	+	+
BFT 11	+	+	+	+	+	+	+
BFT 41	+	+	+	+	+	+	+
BFT 71	+	+	+	+	+	+	+
BFT 87	+	+	+	+	+	+	+
BFT 88	+	+	+	+	+	+	+
BFT 102	+	+	+	+	+	+	+
BFT 106	+	+	+	+	+	+	+
PD 3	+	+	+	+	+	+	+

Os sinais indicam respostas positivas para o crescimento de actinobactérias em diferentes valores de pH.

Colonização radicular *in vitro* de plântulas de tomateiro pelos isolados de actinobactérias

Todos os isolados de actinobactérias colonizaram; *in vitro*, o sistema radicular das plântulas de tomateiro (Tabela 6). A constante exsudação de compostos das células radiculares e dos micro-organismos, como aglutininas, lecitinas, flavonoides e polissacarídeos são responsáveis pelo reconhecimento

entre micro-organismo e planta (AGUILLAR et al., 1988; KIJINE et al., 1988) e o efeito rizosférico que culmina na colonização radicular por micro-organismos (CHET et al., 1990; KORTEMAA et al., 1994).

Tabela 6. Produção de enzimas extracelulares e colonização radicular pelos isolados de actinobactérias.

Isolado	Amilase*	Catalase*	Colonização radicular**
BFT 4	+	+	+
BFT 7	+	+	+
BFT 11	+	+	+
BFT 41	-	+	+
BFT 71	-	+	+
BFT 87	+	+	+
BFT 88	-	+	+
BFT 102	+	+	+
BFT 106	-	+	+
PD 3	+	+	+

*Os sinais indicam respostas positivas ou negativas para a produção de enzimas extracelulares. **Presença (+) de raízes colonizadas.

Oliveira (2009) utilizou um isolado endofítico de *Streptomyces* (R18) e demonstrou a capacidade de colonização *in vitro* de raízes de tomateiro. Sousa et al. (2008) verificaram que os seis isolados de actinobactérias utilizados colonizaram as raízes de plântulas de tomateiro.

Para que uma rizobactéria seja eficiente em cultivos a campo ou em casa de vegetação, esta deve colonizar o sistema radicular da planta hospedeira e ser capaz de competir com bactérias nativas dos mais diversos tipos de solo (FREITAS, 2003). A colonização de raízes é um pré-requisito para a manutenção e sobrevivência de rizobactérias e para o eficiente controle de patógenos do solo, promovendo efeitos benéficos, diretos e indiretos, no crescimento de plantas (MELLO, 1988; ALVEREZ et al., 1995; MARCUZZO, 2010). Diversos trabalhos têm demonstrado que bactérias que colonizam o sistema radicular apresentam significativo controle de espécies de *Meloidogyne* (HALMANN et al., 1998; SIDDIQUI et al., 2000; SIDDIQUI e EHTESHAMUL-HAQUE, 2001; PINHO et al., 2009).

Caracterização fisiológica dos isolados de actinobactérias

Todos os isolados de actinobactérias apresentaram a capacidade de produção de catalase, uma enzima que atua na promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas (Tabela 6). Algumas espécies de actinobactérias, como *S. coelicolor*, produzem três catalases distintas (HAHN et al., 2000) que agem na proteção das plantas contra os estresses osmótico e oxidativo.

Sessenta por cento dos isolados demonstraram a capacidade de produção de amilase (Tabela 6). Amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido em diversos produtos e, progressivamente, em polímeros menores, compostos de unidades de glicose (DASTAGER et al., 2009). O amido é constituído de dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina, sendo o mais importante composto orgânico de reserva das plantas. Entre os poucos micro-organismos com capacidade de degradar o amido, encontram-se as actinobactérias, produzindo ácidos orgânicos, CO₂ e dextrinas durante a decomposição (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os isolados de actinobactérias utilizados neste estudo demonstraram em ensaios *in vitro*, realizados anteriormente (DAMASCENO, 2011) serem produtoras de outras enzimas extracelulares e ácido indolacético, que são importantes no crescimento de plantas e controle de patógenos. Segundo o autor, 30% apresentaram atividade xilanolítica, 80%, atividade celulolítica e quitinolítica, 100% apresentaram atividade lipídica e 60% mostraram a capacidade de produção de ácido indolacético.

A degradação da celulose e da xilana por micro-organismos tem importante papel na decomposição da matéria orgânica do solo ou de substratos de crescimento de plantas, disponibilizando nutrientes e beneficiando o desenvolvimento das mesmas (RAUPACH e KLOEPPER, 1998; COMPANT et al., 2005; SOARES et al., 2010; DAMASCENO e SOARES, 2013). O ácido indolacético afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERE et al., 1986), deixando as plantas com menor suscetibilidade à escassez de nutrientes e ao déficit hídrico (CATTELAN, 1999), atuando no crescimento vegetal.

As quitinases produzidas por muitos organismos, entre eles as actinobactérias, são enzimas com a propriedade de hidrolisar a quitina em oligômeros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e

metabolizados, sendo um dos mecanismos utilizados no biocontrole de nematoides, pela destruição da cutícula (GOODAY et al., 1992; PARK et al., 2002). No solo, a decomposição da quitina libera substâncias tóxicas a fitonematoides como a amônia, uma vez que aquela macromolécula possui teor elevado de nitrogênio. Além disso, a quitina serve como substrato e fonte de energia para as actinobactérias, permitindo a estas competirem com mais eficiência com outros micro-organismos do solo e da rizosfera.

As lipases são importantes no controle de nematoides por degradarem as suas reservas energéticas e por atuar nos lipídios de membrana. Os J2 de *M. javanica*, após eclosão, possuem 30% do seu peso corporal em lipídios, como fonte de reserva energética, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo na planta (ARDUIM, 2006; ROCHA, 2007). Depreende-se, então, que todos estes micro-organismos demonstraram em ensaios *in vitro* atividade lipídica, sendo considerados importantes no controle de nematoides.

Esses resultados corroboram aos obtidos por outros autores para o controle de diversas espécies de nematóides com actinobactérias (WALTER e KAPLAN, 1990; JONATHAN et al., 2000; COIMBRA et al., 2005; PAIXÃO, 2008; SOUSA et al., 2009; COIMBRA e CAMPOS, 2010; DAMASCENO e SOARES, 2013; SANTOS, 2013).

Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias

Pelas características morfológicas dos isolados de actinobactérias, observadas por microscopia óptica, foi possível concluir que os mesmos pertencem ao gênero *Streptomyces* (Figura 1). Estas actinobactérias foram isoladas de solo em plantio de sisal. Segundo Basílio et al. (2003), os gêneros de actinobactérias mais comumente isolados, principalmente de solo, são *Streptomyces* e *Micromonospora*. Entre as características morfológicas, encontram-se a formação de hifas filamentosas e ramificadas, a formação de micélio, o que proporciona às actinobactérias uma aparência pulverulenta característica e a produção de pigmentos.

Os isolados de actinobactérias aqui estudados apresentaram micélio aéreo bem desenvolvido, a maioria com esporos em cadeias curtas e em formato flexuoso e de coloração variada (Tabela 7). Verificou-se variação na coloração do micélio e das colônias, com as cores branco, creme e amarelo. A produção destes

pigmentos, frequentemente, não se limitava apenas ao micélio, mas se difundiam no meio de cultura, alterando a sua coloração com variações nas tonalidades de amarelo/amarronzado a róseo, de acordo com o meio de cultura utilizado. Somente no meio ISP-3 (farinha de aveia-ágar), houve pouca produção de pigmentos, ao observar a placa no sentido inverso. Os esporos das colônias das actinobactérias soltavam-se facilmente do meio sólido, do micélio vegetativo, e foram observados em microscópio estereoscópio (Tabela 7).

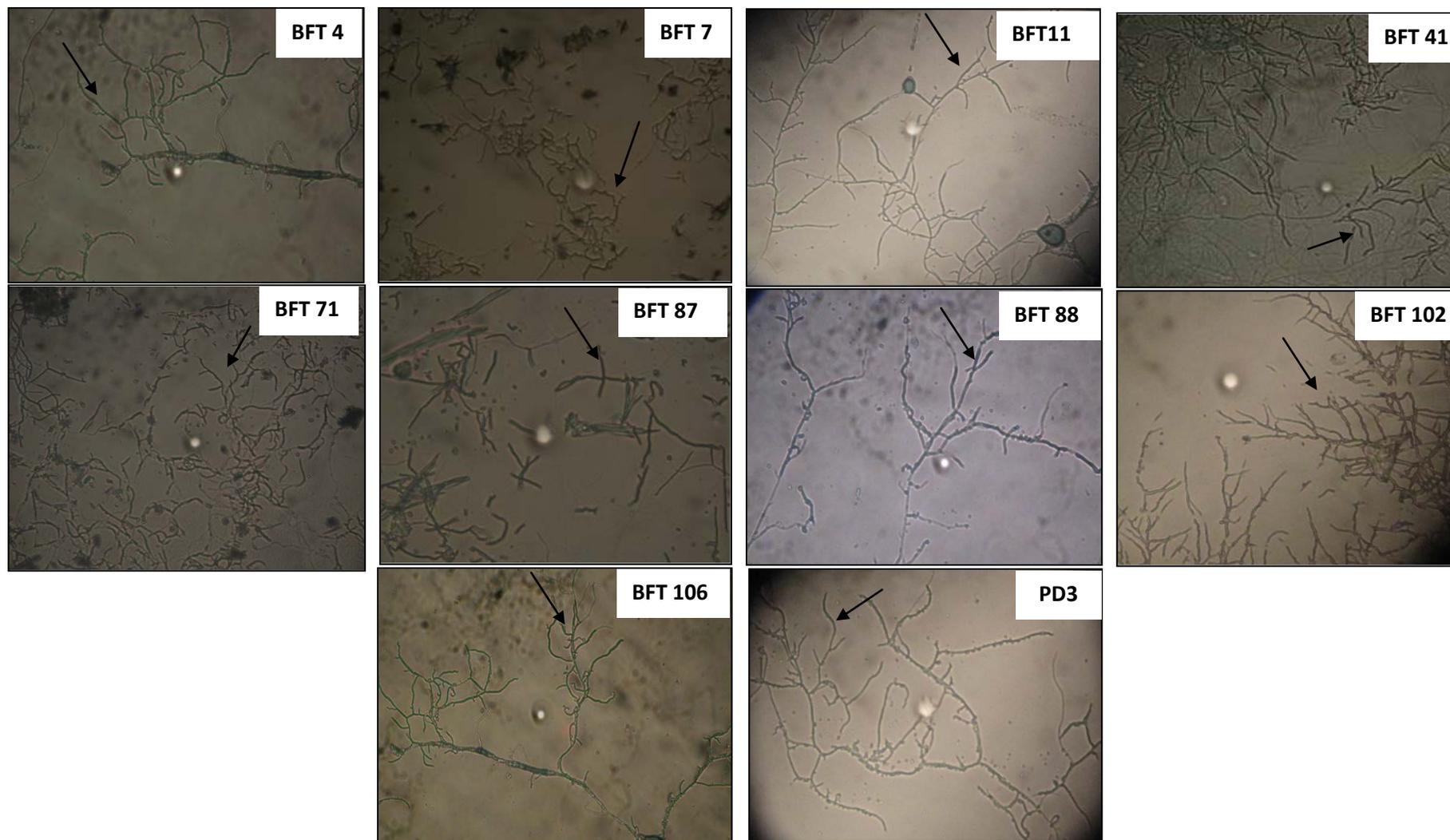


Figura 1. Fotografias obtidas sob microscópio óptico (40 x) dos isolados de actinobactérias, após esporulação (BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 106 e PD 3) em lamínulas posicionadas de forma inclinada em meio de cultura incubado com os isolados de actinobactérias. As setas indicam as cadeias de esporos.

Hopwood (2007) descreveu as colônias de *Streptomyces* como sendo macias, mas que se tornam pulverulentas ou algodonosas à medida que o micélio aéreo e os esporos se desenvolvem. Entre as actinobactérias, as colônias do gênero *Streptomyces* têm crescimento lento, necessitando de sete a dez dias para desenvolver suas hifas aéreas. De acordo com Araújo (1998), o grupo *Streptomyces* apresenta colônias pulverulentas ou velutinas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades. O micélio colorido ocorre pela produção de pigmentos e a aparência pulverulenta decorre da formação do micélio aéreo (RAHMAN et al., 2000; SATHI et al., 2001). As colônias também podem produzir pigmentos solúveis de cores diversas. Entretanto, estas características fenotípicas dependem da composição do meio de cultura (CROSS, 1989).

Tabela 7. Caracterização morfológica de isolados de *Streptomyces* spp. nos meios de cultura cultura sólido à base de extrato de malte, extrato de levedura e ágar (ISP-2), farinha de aveia e ágar (ISP-3), sais inorgânicos, amido e ágar (ISP-4).

Isolados	Cadeia de esporos		Cor								
			Micélio aéreo*			Colônia*			Pigmentos*		
	Formato	Comprimento	ISP 2	ISP 3	ISP 4	ISP 2	ISP 3	ISP 4	ISP 2	ISP 3	ISP 4
BFT4	flexouosa	longa	A	B	B	B/A	B	B	L	Au	M
BFT7	flexouosa	longa	C	C	C	Cz	C	C	L	A	A/A
BFT11	flexouosa	curta	C	B	C	C	B	C	C/A	R	A/A
BFT41	flexouosa	curta	C	C	C	C	C/A	B	C	Au	A
BFT71	flexouosa	curta	C	B	C	B	B/A	C	C	Au	M
BFT87	flexouosa	curta	C/A	C	B	C	B	A	A	A	Au
BFT88	flexouosa	curta	B	B	C	B	A	B	C	Au	R
BFT102	flexouosa	curta	B	B	B	B/A	A	B	L	Au	A
BFT106	flexouosa	curta	C	B	C	B	B	B	C	Au	A/A
PD 3	flexouosa	curta	B	B	B	B	B	B	B	R	M

*A - amarelo; A/A - amarelo/amarronzado; Au – ausência de pigmentos B - branco; B/A - branco amarelado; C - creme; C/A - creme/amarelado; Cz - cinza claro; L - laranja; M - marrom; R - rósea.

Identificação molecular dos isolados de actinobactérias

A análise das sequências de 1400 pb alinhadas do gene 16S rRNA indica que os isolados de actinobactérias pertencem ao gênero *Streptomyces* (Figura 2).

A comparação entre as sequências destes isolados e as sequências encontradas nos bancos de dados públicos indica identidade de 99 % para os

isolados BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 102, BFT 106 a *S. albolongus* (T) NBRC 13465 AB184425 e *S. cavourensis* (T) NRRL2740 DQ445791. O isolado BFT 88 apresentou pequenas diferenças na sequência do gene ribossomal 16S, o que significa que pode se tratar uma espécie nova, mas com 99% de similaridade ao gênero *Streptomyces* (Figura 2).

Streptomyces albolongus tem sido relatado por alguns autores como produtor de metabólitos secundários bioativos, com atividade comprovada frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também com atividade anticancerígena, inibindo o crescimento de células tumorais (YUAN et al., 2010; SUDHA e MASILAMANI, 2011; UDDIN et al., 2013).

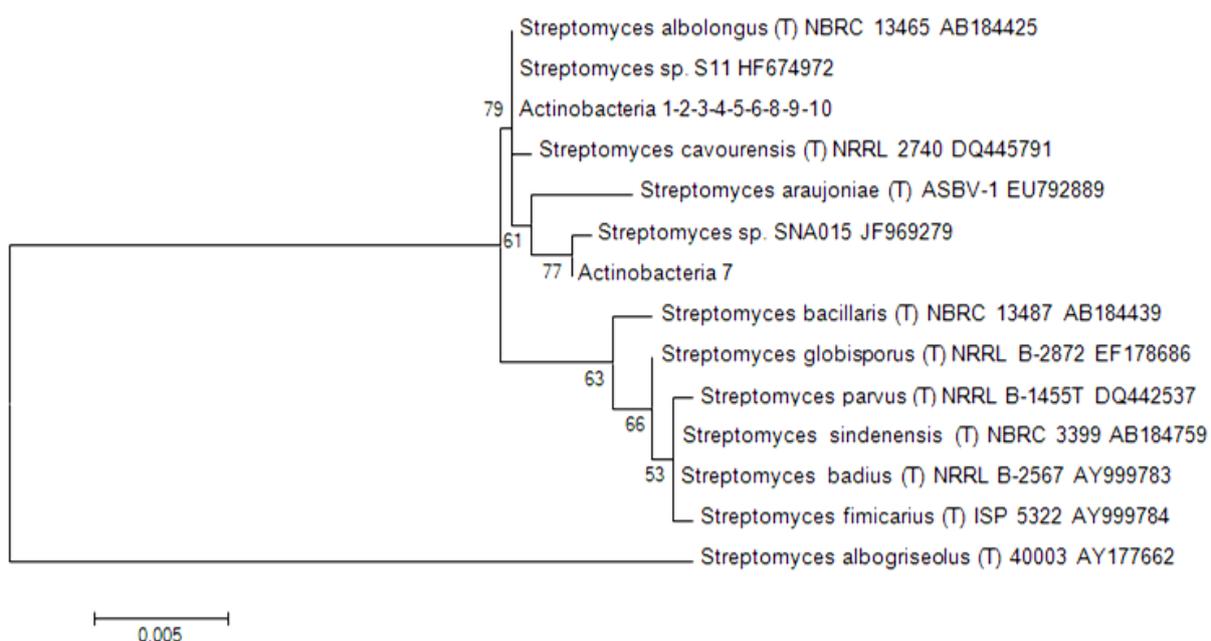


Figura 2. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rDNA dos isolados de *Streptomyces* spp., seguidos do grupo genotípico e do número de acesso no GenBank. Construída pelo método de Maximum Likelihood com a utilização de 500 replicações. Os isolados de actinobactérias estão codificados como: 1. BFT 4, 2. BFT 7, 3. BFT 11, 4. BFT 41, 5. BFT 71, 6. BFT 87, 7. BFT 88, 8. BFT 102, 9. BFT 106 e 10. PD 3.

Entretanto, mais estudos são necessários para a identificação destes isolados de *Streptomyces*, sendo possível apenas indicar, neste trabalho, a similaridade destes isolados em relação às espécies já conhecidas. O gênero *Streptomyces* inclui o maior número de espécies e linhagens dentre as actinobactérias. A identificação por técnicas de biologia molecular é necessária para a identificação taxonômica em espécie, principalmente, pelo uso de

sequências do gene 16S rRNA (VASCONCELLOS, 2008). Porém, somente esta análise é insuficiente para classificar as espécies dentro do gênero *Streptomyces* devido ao grau de complexidade deste táxon (ZHAO et al., 2006). Assim, são utilizados outros métodos complementares, tais como, a caracterização morfológica e a fisiológica que auxiliam na taxonomia, tornando a identificação mais precisa (PRAUSER et al., 1997).

CONCLUSÕES

1. O enriquecimento do solo com esterco bovino e isolados de *Streptomyces* codificados como BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 87, BFT 88 e BFT 102 ou apenas com os isolados de *Streptomyces* promoveu o controle de *M. javanica* no tomateiro;
2. Os isolados de *Streptomyces* codificados como BFT 106 e PD 3 atuam na promoção de crescimento de tomateiro em solo com esterco bovino, mas não têm efeito no controle de *M. javanica*.
3. Os isolados de actinobactérias são produtores das enzimas extracelulares amilase e catalase, sob condições *in vitro*, apresentam a capacidade de colonizar plântulas de tomateiro, *in vitro* e de crescer no solo em ampla faixa de pH;
4. Os isolados de *Streptomyces* apresentaram 99% de similaridade com *S. albolongus* e *S. cavourensis* (BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 102, BFT 106 e PD3) e com o gênero *Streptomyces* (BFT 88).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th ed.. San Diego: Academic Press, 2004. p.826-874.

AGUILLAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* towards

flavonoids inducers of the symbiotcs nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, v. 1345, p.2741- 2746, 1988.

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review: **Bioresource Technology**, v. 74, p. 35-47, 2000.

ALVEREZ, M.A.B.; GAGNÉ, S.; ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promotingrhizobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p. 194-199,1995.

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

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

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

BADRA, T.; SALEH, M.A.; OTEIFA, B.A. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. **Revue Nématologie**, v. 2. p. 29-36, 1979.

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

BARRETO, T. R. **Densidade populacional, diversidade genética e atividade de promoção de crescimento de actinomicetos associados à rizosfera de cacauero.** 2007, 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

BASILIO, A.; GONZÁLEZ, I.; VICENTE, M.F.; GORROCHATEGUI, J.; CABELLO, A.; GONZÁLEZ, A.; GENILLOUD, O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolates under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 814-823, 2003.

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

BRITO, M. A. M. **Streptomicetos promotores de crescimento de plantas de girassol *Helianthus annuus* L. e pinhão manso *Jatropha curcas* L.** 2010, 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2010.

CANNAYANE, I.; G. RAJENDRAN. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongena* L.). **Current Nematology**, v. 12, p. 51-55, 2001.

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

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

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, F.; AYDIN, A.; SAHIN, F. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p. 1482-1487, 2006.

CANTU, R.R.; WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O.; GOTO, R. Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 216-218, 2009.

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

CHAVARRÍA-CARVAJAL, J.A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Changes in soil enzymatic activity and control of *Meloidogyne incognita* using four organic amendments. **Nematropica**, v. 28, p. 7-18, 1998.

CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R; OPPENHEIM, A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, p.85-92, 1990.

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

COIMBRA J.L.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S.; SOUSA, C.S.; RIBEIRO, F.L.B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.41, p.1209-1211, 2006.

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

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high through put rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D633-D642, 2014.

COON, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEK, O.B. Routine tests for the identification of bacteria. In: **Manual of Microbiological Methods** (ed. Society of American Bacteriologists). New York. McGraw-Hall. p.239-262.1957.

COOMBS, J.T.; FRANCO, C.M.M.. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5603-5608, 2003.

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

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

CROSS, T. Growth and examination of actinomicetes – Some guidelines. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9ª ed. Baltimore: Willians & Wilkins, v.4, p. 2340-2343.1989.

DAMASCENO, J. C. A. **Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de tomateiro**. 2011, 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2011.

DAMASCENO, J. C. A.; SOARES, A.C.F. Controle por bactérias. **Cultivar HF**, v. 11, p. 16-18, 2013.

DASTAGER, S.G.; AGASAR, D.; PANDEY, A. Production and partial purification of α -amilase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnonology**, v. 39, p. 189-194, 2009.

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

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**,1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FERREIRA DF. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042, 2011.

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

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

GOMES, C. B.; GRASSI, L. F.; FERRAZ, S.; D'ARC, R. L. O. ; VIEIRA, R, S. Influência do esterco bovino no substrato sobre a multiplicação de *Pasteuria penetrans* em tomateiro. **Nematologia brasileira**, v. 26, p. 59-65. 2002.

GONZALEZ, A.; CANTO-SAENZ, M. Comparison of five organic amendments for the control of *Globodera pallida* in microplots in Peru. **Nematropica**, v. 23, p. 133-139, 1993.

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

HALBRENDT, J. M.; LaMONDIA, J. A. Crop rotations and other cultural practices. In: CHEN, Z., CHEN, S.; DICKINSON, D. W. (ed). **Nematology – Advances and Perspectives**. Volume II: Nematode Management and Utilization. Tsinghua University Press & CABI Publishing, p. 909-930. 2004.

HAHN, J.S.; OH,S.Y.; CHATER, K.F.; CHO, Y.H.; ROE, J.H. H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. In **Journal of Biology Chemistry**, v. 275, p. 38254-38260, 2000.

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p.551-560, 1999.

HOPWOOD, D.A. Therapeutic treasures from the deep. In: **Nature Chemistry Biology**, v. 3, p. 457-458, 2007.

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

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

KAZUYOSHIET, C.; FURUKAWA, M.; FUKUDA, S.; SHOJI, M.; YANAGISAWA, T.; HIDEO. I.; TERUO, S.; AKIRA, N. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. **Biocontrol Science**, v.7, p.25-29, 2002.

KIJINE, J. Lecithin-enhanced accumulation of manganese limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**. v.170, p. 2994- 3000, 1988.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes Orgânicos**. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba (SP), 1985, 492 p.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto**. 4ª ed. E.J. Kiehl. Piracicaba. 2004, 173 p.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum* Plant Associations. CRC Press, Boca Raton, pp. 137-166, 1994.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v.106, p.47-150, 2004.

KORTEMAA, H.; RITA, H.; HAAHTELA, K.; SMOLANDER, A. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. **Plant and Soil**, v. 163, p. 77-83. 1994.

KÜSTER, E. Outline of a comparative study criteria used in characterization of the Actinomycetes. **International Bulletin of Bacteriology**, v. 9, p. 98-104, 1959.

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

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, O.D.; GARDIANO, C.G.; CARVALHO, S.C. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 78- 84, 2007.

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

MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; CANEDO, E.J. *Paecilomyces lilacinus* e esterco bovino para o controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro e alface. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 231-235, 2010.

MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A.; CANEDO, E.J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e esterco bovino. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 590-596, 2013.

MALHERBE, S.; CLOETE, T.E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, v.1, p.105-114, 2002.

MARCUZZO, L.L. Efeito de rizobactérias sobre o biocontrole e promoção de crescimento de plantas. **Ágora: Revista Divulgação Científica**, v. 17, n. 1, 2010.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universitária, 2000. p. 67-108.

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

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 143-150, 2010.

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

OLIVEIRA, M.F. **Prospecção de actinomicetos endofíticos de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e sua otimização.** 140p. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

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

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

PINHO, R.S.C.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R.M.; SILVA, J.R.C.; OLIVEIRA, M.S.; PIMENTEL, G.C.S. COSTA, L.S.A.S. C. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 33, p. 54-60, 2009.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A Selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1957.

PRAUSER H.; SCHUMANN P.; RAINEY F.A.; KROPPESTEDT R.M.; STACKEBRANDTE. *Terracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from Soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 42, p. 1218-1224. 1997.

RAHMAN, M.A.; AZAM, A.T.M.Z.; GAFUR, M.A. In vitro antibacterial principles of two flavonoids and extracts from *Clerodendrum indicum* Linn. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.3, p. 1769-1771, 2000.

RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158-1164, 1998.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural by products for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.22- 27, 2005.

RITZINGER, C.H.S.P.; McSORLEY, R. Effect of castor and velvetbean organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Journal of Nematology**, v. 30, p. 624-631, 1998.

RITZINGER, C.H.S.P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 331-338, 2006.

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

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KOKALIS-BURELLE, N.; ROBERTSON, D. G.; KING, P. S.; WELLS, L. W. Rotations with coastal bermudagrass, cotton and bahiagrass for management of *Meloidogyne arenaria* and southern blight in peanut. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 665-668, 1994.

SANTOS, J.F. **Actinobactérias e adubação orgânica no manejo de *Scutellonema bradys* no crescimento e nutrição de plantas de inhame.** 2013. 105f Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

SANTOS, B.H.C.; RIBEIRO, R.C.F.; XAVIER, A.A.; MOTA, V.J.G. Controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de bananeira 'prata-anã' por compostos orgânicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v .35, p. 650-656, 2013.

SATHI, Z.S.; RAHMAN, M.A.A.; GAFUR, M.A. Identification and *in vitro* antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 1523-1525, 2001.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.16, p. 313-340, 1966.

SIDDIQUI, I.A.; S. EHTESHAMUL-HAQUE, S. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root root-knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterranea**, v. 28, p. 189-192, 2000.

SIDDIQUI, Z.A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I.. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.

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

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

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

SOUSA, C.S. **Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro**. 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2006.

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

SOUSA, C.S.; SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M.S. Caracterização de estreptomicetos com potencial para promoção de crescimento de plantas e biocontrole. **Sciencia Agricola**, v. 65, p. 50-55, 2008.

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

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural of Products**. v.67, p. 257–268, 2004.

SUDHA S.; MASILAMANI, S M. *Streptomyces cavourensis* sp. SU 3 Nov., A Novel Marine Streptomyccete isolated from A Sea Shore Sediment in Chennai. **Advanced Biotechnologies**. v. 11, p. 32-36, 2011.

TANAKA, Y.T.; OMURA, S. Agroactive compounds of microbial origin. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 57-87, 1993.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

WALTER, D.E.; KAPLAN, D.T. Antagonists of Plant-parasitic Nematodes in Florida Citrus. **Journal of Nematology**, v. 22, p. 567-573, 1990.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v 173, p.697-703, 1991.

WILLIAMS, J.; CLARKSON, J. M.; MILLS, P. R.; COOPER, R. M. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 4190–4191, 2003.

WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds) Current Protocols in Molecular Biology, pp. 2.4.1–2.4.5. John Wiley & Sons, New York, 1987.

UDDIN, M.; MAHMUD, N.; ANWAR, N.; MANCHUR, M.A. Bioactive metabolite production by *Streptomyces albolongus* in favourable Environment. **Journal of Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, p. 75-82, 2013.

VASCONCELLOS, R.L.F. **Actinobactérias da rizosfera de *Araucária angustifolia* com potencial biotecnológico**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, p. 495–548, 2007.

YUAN, X., YANG, R.; XUE CAO, X.; GAO, J. Taxonomic identification of a novel strain of *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis*, ACMA006, exhibiting antitumor and antibacteria activity. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.4, p. 405-411, 2010.

CAPÍTULO 2

RESÍDUO SÓLIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial do periódico científico Scientia Horticulturae

RESÍDUO SÓLIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO

Autores: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno, Fábio Nascimento de Jesus, Ana Cristina Fermino Soares e Rosane da Silva Sant'ana

Resumo: Este trabalho teve o objetivo de estudar o extrato aquoso e o pó moído provenientes do resíduo sólido e seco do desfibramento de folhas de sisal no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Foram conduzidos bioensaios *in vitro* com 100 μ L de suspensão aquosa contendo 300 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* e 1000 μ L do extrato aquoso. Os tratamentos consistiram do extrato aquoso a 2,5%; 5,0%; 7,5%; 10,0%; 12,5%; 15,0%; 17,5%; 20,0%; 22,5%; 25,0%; 27,5% e 30,0%; as testemunhas sem o extrato e com Carbofuran a 50 mg i.a.L⁻¹, com a imersão dos J2 por 24 e 48 horas. Em casa de vegetação, foram conduzidos dois ensaios. No primeiro, aos sete dias após o transplântio, fez-se a aplicação do extrato aquoso nas concentrações de 0%, 10%, 20%, 30% e 40%. Para o segundo ensaio, o pó moído foi misturado ao solo nas doses equivalentes a 0, 10, 20, 30 e 40 t ha⁻¹, com incubação por dez dias, seguidos do transplântio do tomateiro. Em ambos os ensaios, as plantas foram inoculadas com 4000 indivíduos de *M. javanica*. As testemunhas foram constituídas por água destilada e o nematicida Carbofuran. Aos quarenta dias após a inoculação, foram analisados o crescimento vegetativo e os danos nas raízes. Todas as concentrações do extrato aquoso apresentaram efeito nematicida nos testes *in vitro*, após 48 horas de exposição dos nematoides. Obteve-se 96% de mortalidade dos J2 com o extrato na concentração de 30%. Este extrato, em todas as concentrações, causou reduções significativas nos números de galhas e de massas de ovos por planta (média de 46% e 45%) e por grama de raízes do tomateiro (média de 37% e 39%), respectivamente. A aplicação de 20 e 30 t ha⁻¹ do pó moído reduziu o número de galhas por planta (51,0% e 37%) e por grama de raízes (42% e 26%) e o número de massas de ovos por planta (58% e 46%) e por grama de raízes (39% e 24%), respectivamente. A aplicação no solo de 40 t ha⁻¹ do resíduo seco causou fitotoxicidade no tomateiro.

Palavras-chave: Resíduos agrícolas, nematoide-das-galhas, controle cultural, *Solanum lycopersicum*.

SISAL (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) LEAF DECORTICATION SOLID RESIDUE FOR CONTROLLING *Meloidogyne javanica* IN TOMATO PLANTS

Authors: Josilda Cavalcante Amorim Damasceno, Fábio Nascimento de Jesus, Ana Cristina Fermino Soares e Rosane da Silva Sant'ana

Abstract: This study aimed to evaluate the effect of the aqueous extract and the ground powder obtained from sisal solid and dry residue from leaf decortication, in controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato plants. *In vitro* bioassays were conducted with 100 µL of an aqueous suspension with 300 juveniles of *M. javanica* and 1000 µL of the aqueous extract. The treatments consisted of nematode immersion for 24 and 48 hrs in sisal aqueous extract, at concentrations of 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5%, 15.0%, 17.5%, 20.0%, 22.5%, 25.0%, 27.5% and 30.0%, and controls with water and Carbofuran. Two assays were conducted with tomato plants under greenhouse conditions. For the first assay, aqueous extract at concentrations of 0%, 10%, 20%, 30% and 40% was applied to soil, seven days after transplantation of tomato plants. For the second essay, dry triturated sisal solid residue was amended to soil and incubated for ten days, followed by tomato plants transplantation. For both assays, plants were inoculated with 4000 individuals of *M. javanica*. As control treatments, distilled water and Carbofuran were used. Forty days after inoculation, plants were harvested and evaluated for growth and root damage. All concentrations of the aqueous extract presented nematicidal effect, after 48 hrs of nematode exposure. A mortality rate of 96% was obtained for *M. javanica* J2 exposed to the extract at a concentration of 30%. All concentrations of the aqueous extract caused a reduction in the numbers of galls and egg masses per plant (average of 46% and 45%) and per gram of roots of tomato (average of 37% and 39%) respectively. Soil amendment with ground powder at 20 and 30 t ha⁻¹ caused a decrease in the number of galls per plant (51% and 37%) and per gram of root of (42% and 26%), and in the number of egg masses per plant (58% and 46%) and per gram of roots (39% and 24%), respectively. Soil amendment of 40 t ha⁻¹ of ground powder cause phytotoxicity in tomato plants.

Key-words: agricultural residues, root-knot nematode, cultural control, *Solanum lycopersicum*.

INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma cultura de grande importância econômica, sendo uma das mais cultivadas, devido à versatilidade quanto ao consumo do tomate e o valor nutritivo e comercial deste fruto (FERNANDES et al., 2007).

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi (1887) são os mais importantes nematoides fitopatogênicos, pois, apresentam ampla distribuição geográfica e causam consideráveis prejuízos econômicos a uma ampla gama de culturas em todo o mundo (REGAIEG et al., 2010). Os nematicidas para o controle do nematoides-das-galhas são altamente tóxicos e de longo efeito residual. O uso destes produtos onera o custo de produção e contamina o meio ambiente.

Métodos alternativos, como a incorporação ao solo de compostos orgânicos de origem vegetal, tortas de resíduos e pó de materiais vegetais de diferentes espécies de plantas vêm sendo estudados no manejo desses nematoides (MAISTRELLO et al. 2010; RIBEIRO et al., 2012). A utilização do resíduo do desfibramento das folhas de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex. Engelm) no controle de fitonematoides representa mais uma alternativa para os produtores, além de ter baixo custo e não oferecer riscos de contaminação do ambiente.

O principal produto da exploração do sisal é sua fibra e esta, naturalmente resistente e de fácil industrialização, tem sido procurada por muitos investidores e tem ocupado lugar de destaque na cadeia de produção. O sisal é a principal fonte de fibras duras vegetais do mundo, sendo responsável por quase 70% da produção comercial de todas as fibras desse tipo. O Brasil é, hoje, o maior produtor e exportador de fibras e manufaturados de sisal e o cultivo ocorre em 112 municípios do Nordeste, sendo a Bahia o maior produtor nacional dessa fibra, concentrando 95% da produção sisaleira do País (SECTI, 2014).

A fibra de sisal representa somente 4% da folha e os resíduos sólidos e aquosos constituem os restantes 96% (BANDEIRA e SILVA, 2006; SUINAGA et al., 2006), que são abandonados nas propriedades rurais, sem qualquer aproveitamento. Estes, no entanto, poderiam ser utilizados como matéria-prima abundante e barata para fins agrícolas e industriais.

A mucilagem, denominada de resíduo e também de bagaço, é abandonada no campo ou utilizada por alguns poucos produtores na adubação do sisal, sendo parcialmente espalhada na própria cultura, de maneira convencional e sem critérios técnicos (SILVA e COUTINHO, 2006). Além dessas práticas, o resíduo de sisal tem sido utilizado também para a alimentação de bovinos, como suplemento alimentar (SILVA e BELTRÃO, 1999; FARIA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2011).

Alguns autores têm demonstrado resultados promissores com o resíduo líquido do sisal no controle do ácaro rajado e da lagarta-do-cartucho (POTENZA et al., 2006; SOUZA, 2009). O aumento nas concentrações de resíduo de *A. americana* inibiu a germinação de conídios de *Alternaria brassicae* (GULERIA e KUMAR, 2009). Jesus et al. (2013) inocularam mudas de tomateiro com J2 de *M. javanica* tratados *in vitro* com o resíduo líquido fresco e fermentado de sisal nas concentrações de 2,5% até 15% e verificaram que ambos os resíduos promoveram redução no número de galhas por planta e por grama de raízes em todas as concentrações.

Garcia et al. (1999) observaram que extratos de espécies de *Agave* apresentam atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e constituem uma importante fonte de sapogeninas esteroides, principalmente hecogeninas. Santos et al. (2012) utilizaram o resíduo líquido de sisal a 20%, 40%, 60%, 80% e 100% no controle do nematoide da casca preta do inhame (*Scutellonema bradys*) sob condições *in vitro*. Observaram que o resíduo líquido de sisal apresentou efeito nematicida nas concentrações a partir de 20%.

Contudo, não foram encontrados, na literatura, trabalhos que relatassem a utilização do resíduo seco do sisal no controle de nematoides. Em vista disso, este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência do extrato aquoso de sisal na mortalidade de J2 de *M. javanica* sob condições *in vitro* e o efeito do extrato aquoso e de diferentes doses do pó moído provenientes do resíduo sólido seco, no controle desse nematoide em tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do pó proveniente do resíduo sólido de sisal

O resíduo sólido de sisal foi coletado no campo, no momento do desfibramento das folhas, utilizando-se uma pá limpa para retirar a parte sólida do compartimento da máquina, tipo Paraibana, empregada no desfibramento de sisal, no município de Valente, Bahia. O resíduo foi colocado em sacos de plástico e transportado no mesmo dia para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, onde o material foi colocado para secar em estufa de ventilação forçada a 65°C até a obtenção de massa constante e, em seguida, foi triturado em Micro Moinho tipo Willye TE 648 (Anexo, Figs. E e F).

Obtenção do extrato aquoso de sisal

Na obtenção do extrato aquoso proveniente do resíduo sólido, foram medidos 10 g do material triturado e adicionados 10 mL de água destilada. A suspensão permaneceu em repouso por 24 horas em frascos de Erlenmeyer envolvidos em papel alumínio e mantidos à temperatura ambiente. Após este período, o material foi macerado em almofariz e centrifugado por 2 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi recolhido em Becker para utilização nos ensaios e o pellet foi descartado.

Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Na obtenção dos ovos e J2, raízes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, cultivado em casa de vegetação, inoculadas com *M. javanica*, foram lavadas e trituradas em liquidificador por 20 segundos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 200 mesh e uma peneira inferior de 500 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão preparada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso.

Na desinfestação dos J2, a suspensão obtida na câmara de eclosão foi transferida para uma peneira de 500 mesh, na qual os J2 ficaram retidos. A peneira com os J2 foi imersa numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante

1 minuto, seguido de quatro lavagens com água destilada esterilizada. Para confirmação da espécie, foi utilizado a isoenzima esterase, identificada por meio da eletrofose vertical em géis de bis-acrilamida (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001). A suspensão de ovos/juvenis foi calibrada em câmara de contagem de Peters sob microscópio estereoscópio.

Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco sobre a mortalidade *in vitro* de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, seguindo-se o delineamento inteiramente ao acaso com quatorze tratamentos e quatro repetições. Os bioensaios foram conduzidos em tubos de microcentrífuga, sendo cada tubo considerado como uma parcela.

Para os bioensaios, foram utilizados 100 µL de uma suspensão aquosa contendo 300 J2 de *M. javanica* e 1000 µL do extrato aquoso. Foram avaliadas as seguintes concentrações: 0,0% (sem extrato), 2,5%; 5,0%; 7,5%; 10,0%; 12,5%; 15,0%; 17,5%; 20,0%; 22,5%; 25,0%; 27,5% e 30% do extrato aquoso de sisal diluído em água destilada esterilizada (concentrações definidas por testes preliminares) e o controle com o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) a 50 mg i.a.L⁻¹, conforme Nassu et al. (2010).

Os tubos com os bioensaios foram incubados a 28 °C, em câmara de crescimento tipo BOD e, após 24 e 48 horas, os nematoides foram retirados dessa suspensão, lavados com água esterilizada, realizando-se a contagem dos indivíduos imóveis em câmara de Peters. Após a contagem, os nematoides foram colocados em água por mais 24 horas, sendo em seguida, adicionada uma gota de solução aquosa de hidróxido de sódio (1,0 M) em cada tubo e contados os indivíduos, sendo os retos e imóveis considerados mortos, enquanto que os retorcidos ou móveis foram considerados vivos.

Foi realizada análise dos contrastes ortogonais entre os tratamentos com o extrato aquoso e o nematicida. Os dados foram transformados em arcsen $(x/100)^{0,5}$ e submetidos à análise de variância e de regressão. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro

Em casa-de-vegetação, mudas de tomateiro grupo Santa Cruz Kada cultivadas em bandeja contendo o substrato Vivatto Slim[®], foram transplantadas com 20 dias de idade para vasos contendo 2 L de solo misturado com areia na proporção de 1:1(v/v), esterilizado em autoclave a 120°C por 1 hora e 30 minutos por duas vezes, em dias alternados. O solo utilizado foi um Latossolo com as seguintes características químicas: pH (H₂O) 6,6; Ca⁺² 4,8 Cmol_d/dm³; Mg⁺² 1,7 Cmol_d/dm³; P 78 Mg/dcm³; K 0,09 Cmol_c /dcm³; SB 6,9 Cmol_d/dm³; CTC 7,7 Cmol_d/dm³; V 84,8% Cmol_d/dm³ (EMBRAPA, 2009).

Aos sete dias após o transplante, realizou-se a inoculação com 4000 indivíduos de *M. javanica*. Dois dias após a inoculação, procedeu-se a aplicação de 100 mL do extrato aquoso obtido do resíduo sólido seco e moído e duas aplicações posteriores foram realizadas a cada dez dias, após a data de aplicação da primeira. O ensaio foi instalado em blocos inteiramente ao acaso, com sete tratamentos e 15 repetições.

Foram testadas as seguintes concentrações do extrato aquoso de sisal: 0%, 10%, 20%, 30% e 40%, além de dois tratamentos testemunha (água destilada e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) na dose de 0,5 g por vaso, seguindo o trabalho de Nassu et al. (2010), com modificações. Estes autores utilizaram 2,0 g por vaso, o que causou fitotoxicidade no tomateiro e, por este motivo, a dose foi reduzida para 0,5 g, após testes preliminares realizados no tomateiro. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo uma muda de tomateiro.

O tomateiro foi coletado aos quarenta dias após inoculação. Na coleta, avaliaram-se a altura da planta e o diâmetro do caule, com uma régua e um paquímetro, respectivamente. Em seguida, foi retirada a parte aérea e esta foi colocada em saco de papel pardo para secagem em estufa com ventilação forçada a 65 °C até atingir massa constante, a qual foi registrada.

Para a contagem dos números de galhas e de massas de ovos, o sistema radicular foi lavado em água corrente e corado de vermelho, por imersão durante 15 minutos em solução a 1% do corante artificial de ponceau 4R e vermelho 40 e, posteriormente, deixado em água por 10 minutos à temperatura ambiente (28 ± 2 °C). O excesso de água foi removido, colocando-se as raízes sobre papel toalha por 15 minutos. As raízes passaram pela determinação da massa da matéria fresca, seguidas da contagem dos números de galhas e de massas de ovos. Após a contagem, as raízes foram colocadas para secar em estufa com ventilação

forçada a 65 °C, até atingir massa constante, para determinação da massa da matéria seca.

Os dados foram submetidos às análises de variância e de regressão em função das concentrações do extrato. Fez-se, também, a análise de contrastes ortogonais comparando as concentrações do extrato e o nematicida. Para estas análises, foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Avaliação do pó moído proveniente do resíduo sólido seco do sisal em casa de vegetação

O pó moído obtido do resíduo sólido e seco, nas diferentes doses, foi misturado ao solo esterilizado, homogeneizado e mantido em sacos de plástico na casa de vegetação à temperatura ambiente, para incubação por 10 dias. Após este período, o solo foi transferido para vasos com capacidade para 2 L, seguido do transplântio de uma muda de tomateiro com 20 dias de idade. Aos sete dias após o transplântio, fez-se a inoculação das mudas com uma suspensão calibrada para aplicar 4000 indivíduos de *M. javanica* por planta.

Foram utilizadas cinco doses do resíduo seco e moído: 0, 10, 20, 30 e 40 t ha⁻¹, além de água destilada e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC), na dose de 0,5 g por vaso, para os tratamentos controle. O delineamento foi em blocos casualizados, com 15 repetições. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo uma muda de tomateiro.

O tomateiro foi coletado aos quarenta dias após inoculação. Na coleta, avaliaram-se a altura e o diâmetro, com uma régua e um paquímetro, respectivamente. Em seguida, foi retirada a parte aérea da planta e a mesma foi posta para secar em estufa com ventilação forçada a 65 °C até atingir massa constante que, em seguida, foi registrada.

Para a contagem dos números de galhas e de massas de ovos, amostras de raízes frescas foram separadas e lavadas, cuidadosamente. Em seguida, foram coloridas de vermelho, em solução a 1%, contendo corante artificial de ponceau 4R e vermelho 40. As raízes foram imersas na solução corante em um béquer de 500 mL, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram retiradas da solução e transferidas para um béquer contendo água por mais 10 minutos. Após a coloração, as raízes foram colocadas sobre papel toalha por 15 minutos. Em seguida, foi feita a determinação da massa de matéria fresca e

contagem dos números de galhas e de massas de ovos. Após a contagem, as raízes foram colocadas para secar em estufa com ventilação forçada a 65 °C, até atingir massa constante, para determinação da massa da matéria seca das raízes. Os dados foram submetidos às análises de variância e de regressão em função das doses do resíduo. Fez-se também a análise de contrastes ortogonais comparando as doses do resíduo e o nematicida. Para estas análises, foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco sobre a mortalidade *in vitro* de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

O teste de regressão polinomial indicou que houve redução na mobilidade dos J2 de *M. javanica* com o aumento da concentração do extrato aquoso de sisal, após 24 horas de exposição (Figura 1). A redução da mobilidade variou de 86% para a concentração de 2,5% até 99% na concentração de 30%. A partir da concentração 17,5%, não houve diferença entre os tratamentos.

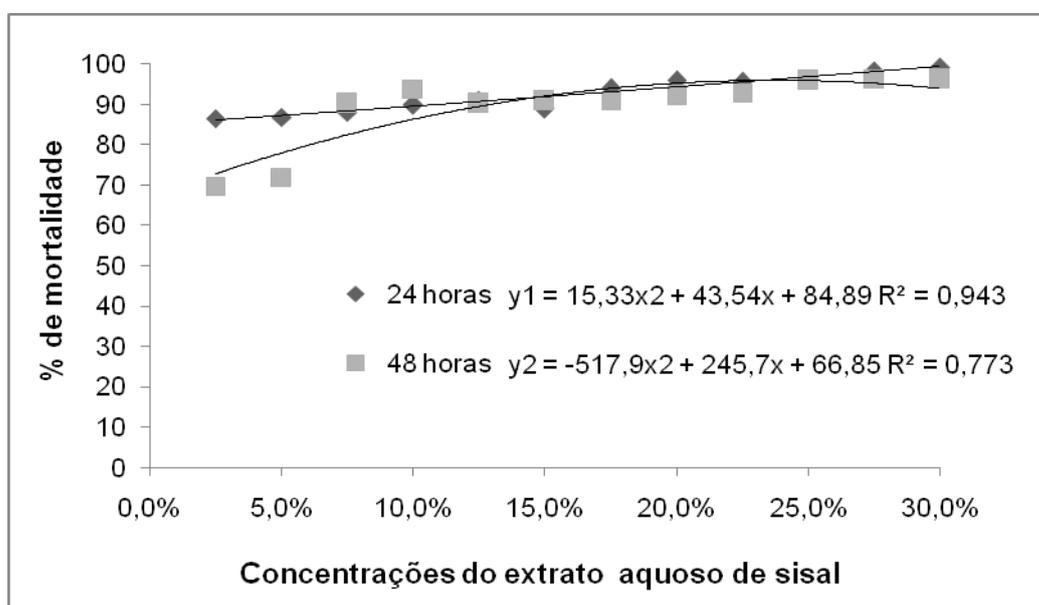


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações do extrato aquoso proveniente do resíduo sólido e moído de sisal sobre a mortalidade de juvenis de segundo estágio J2 de *Meloidogyne javanica*, após 24 e 48 horas de exposição.

A mortalidade dos J2 aumentou significativamente ao aumentar as concentrações do extrato, alcançando 96% quando os J2 foram expostos ao extrato aquoso na concentração de 30% por 48 horas. Os J2, quando expostos ao extrato nas concentrações acima de 7,5%, não retomaram a mobilidade após

serem transferidos para água. Com o nematicida, houve 100% de mortalidade após 48 horas de exposição dos J2.

Tabela 1: Estimativas dos contrastes ortogonais (nematicida x concentrações do extrato aquoso de sisal) e significância para as variáveis avaliadas no controle *in vitro* de *Meloidogyne javanica*.

CONTRASTES	MORTALIDADE	
	24 HORAS	48 HORAS
2,5% X Nematicida	60,147**	-30,332**
5,0% X Nematicida	60,503**	-25,280**
7,5% X Nematicida	61,725**	-6,053**
10,0% X Nematicida	64,488**	-4,192**
12,5% X Nematicida	64,427**	-9,796*
15,0% X Nematicida	67,739**	-9,188*
17,5% X Nematicida	62,404**	-9,012*
20,0% X Nematicida	69,557**	-8,000*
22,5% X Nematicida	69,288**	-7,135 ^{ns}
25,0% X Nematicida	72,044**	-3,177 ^{ns}
27,5% X Nematicida	72,736**	-3,580 ^{ns}
30,0% X Nematicida	70,696**	-3,592 ^{ns}

** - significativo a 1%; * - significativo a 5%; ns- não significativo a 5%.

Os J2 submetidos ao tratamento apenas com água (sem extrato) apresentaram mobilidade em 100% dos indivíduos após 24 horas e a taxa de mortalidade após 48 horas de exposição foi de apenas 5%, o que se deveu, provavelmente, à presença de nematoides inviáveis submetidos à água destilada ou ao início do esgotamento de suas reservas lipídicas. Comparando-se a imobilidade e mortalidade dos nematoides causadas pela exposição ao extrato aquoso e ao nematicida, verificou-se que este reduziu a mobilidade em apenas 26% dos J2, quando expostos por um período de 24 horas, indicando um efeito mais lento se comparado ao extrato.

Avaliando os contrastes ortogonais, verificou-se que a partir da concentração de 22,5% do extrato aquoso, o mesmo não diferenciou estatisticamente do tratamento com o nematicida, comprovando, assim, a ação nematicida do extrato aquoso proveniente do resíduo sólido de sisal (Tabela 1).

Trabalhos realizados por outros autores também constataram eficiência do extrato de sisal sobre diferentes patógenos. Morais et al. (2010) avaliavam o efeito dos extratos de *A. sisalana* e de alho (*Allium sativum*) nas concentrações de

0%, 10%, 20%, 30% e 40% sobre a germinação de conídios e o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, em feijão-vagem. Os autores concluíram que, na medida em que as concentrações desses produtos aumentaram, a porcentagem de germinação e o diâmetro das colônias diminuíram.

Barreto et al. (2010) avaliaram a eficiência dos extratos fresco (24 horas após a maceração) e curtido (35 dias depois) de dois genótipos de *Agave* (*A. sisalana* e o híbrido 11648, resultante do cruzamento entre *A. angustifolia* e *A. amaniensis*) no controle do ácaro rajado [*Tetranychus urticae* (Koch), Tetranychidae] do algodoeiro. Observaram que houve diminuição do número de ácaros vivos com as aplicações dos extratos e que a eficiência do extrato curtido do híbrido foi de 100%.

Silveira (2009) avaliou a ação do resíduo de *A. sisalana* sobre o desenvolvimento *in vitro* de nematoides gastrintestinais de ovinos e caprinos e concluiu que o resíduo líquido de sisal interferiu na motilidade dos indivíduos adultos de *Haemonchus contortus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Botura et al. (2011) que também avaliaram a atividade biológica do extrato bruto das folhas e do resíduo de *A. sisalana* e verificaram que houve eficácia no controle de nematoides gastrointestinais em ovinos.

Soares e Damasceno (2011), em trabalhos com resíduo líquido do sisal no controle de *M. javanica*, sob condições *in vitro*, verificaram que o resíduo líquido de sisal em concentrações que variaram entre 2,5% e 10% causou mortalidade dos J2, variando de 86% a 92%. Os autores observaram, ainda, que, nas concentrações acima de 12,5%, houve 100% de mortalidade.

Extrato aquoso de sisal proveniente do resíduo sólido seco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro

Nas concentrações mais altas do extrato aquoso, houve uma tendência de redução na altura e no diâmetro caulinar das plantas (Figuras 2A e 2B).

A concentração do extrato aquoso influenciou a produção de matéria seca da parte aérea e das raízes do tomateiro, com diferenças significativas entre os tratamentos (Figuras 3A e 3B). A maior quantidade de matéria seca da parte aérea foi obtida no tratamento com 10% do extrato aquoso. O aumento na concentração do extrato aquoso causa a redução na massa da matéria seca da parte aérea, conforme verificado no modelo quadrático da regressão. Nas

concentrações de 30% e 40%, essa redução foi de 48%, indicando que houve efeito fitotóxico (Figura 3A).

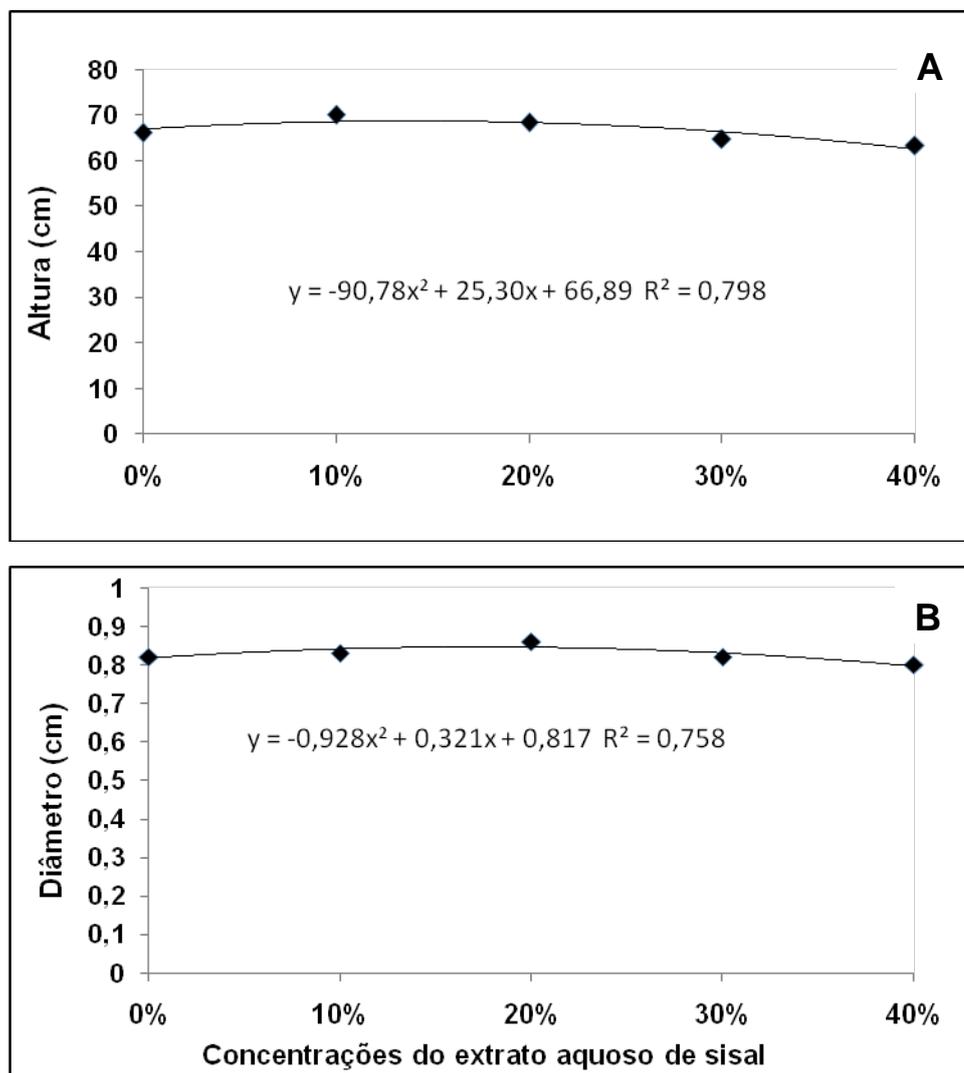


Figura 2. A) Altura e B) Diâmetro caulinar de tomateiros tratados com diferentes concentrações de extrato aquoso proveniente do resíduo sólido seco e moído de sisal.

A massa da matéria seca das raízes das plantas tratadas com o extrato aquoso foi superior ao tratamento controle (sem extrato), em todas as concentrações, com incrementos de até 23% (Figura 3B).

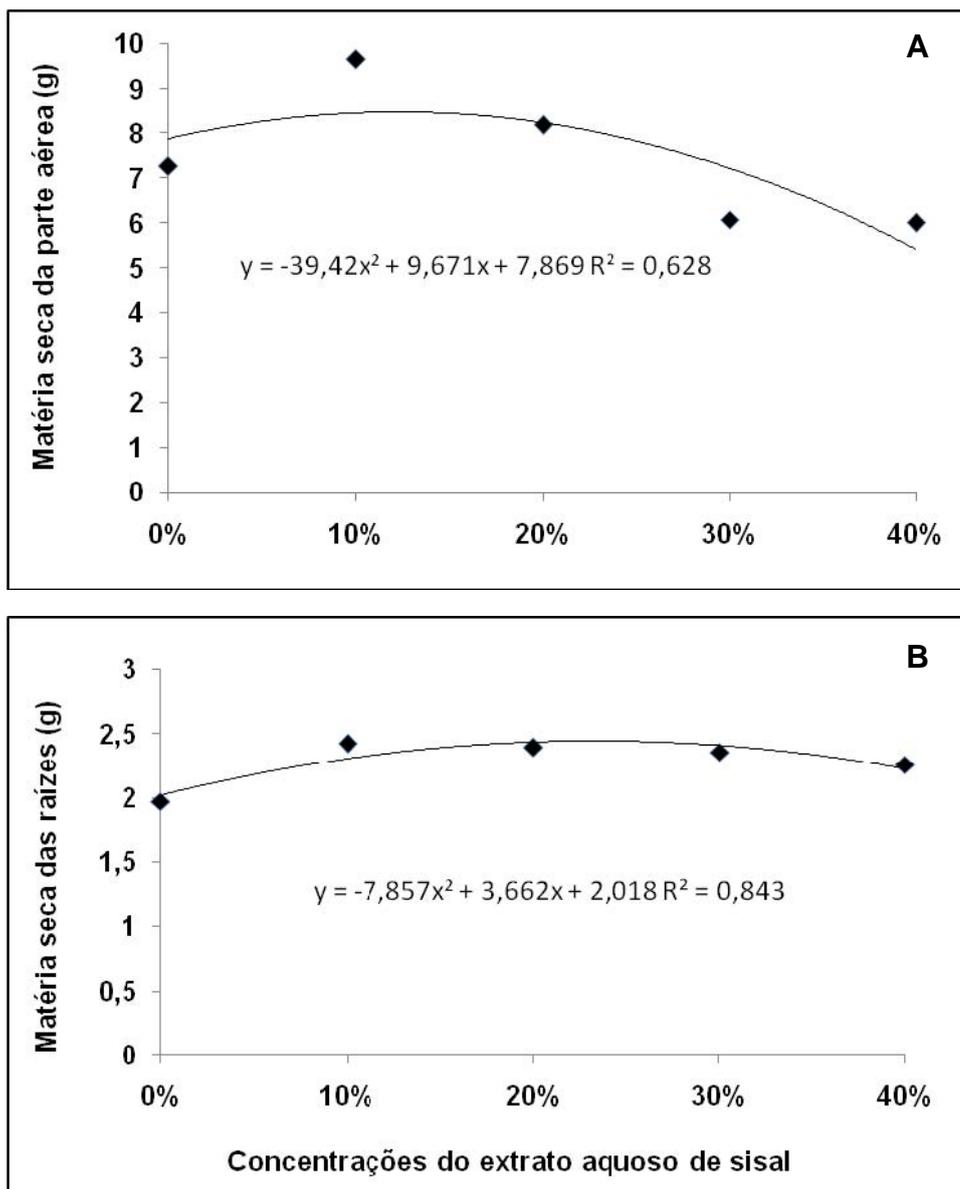


Figura 3. A) Massas das matérias secas da parte aérea e B) das raízes de tomateiros tratados com diferentes concentrações de extrato aquoso proveniente do resíduo sólido seco e moído de sisal.

Avaliando os contrastes ortogonais, verificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com o extrato aquoso de sisal e com o nematicida, em todas as concentrações, para altura, diâmetro caulinar e massa da matéria seca das raízes dos tomateiros. Para a massa da matéria seca da parte aérea, exceto o extrato na concentração a 10%, as demais diferiram estatisticamente do tratamento com o nematicida. As plantas submetidas aos tratamentos com o extrato nas concentrações a 30% e a 40% apresentaram biomassa da parte aérea inferior ao tratamento com o nematicida (Tabela 2), indicando efeito fitotóxico do extrato ao tomateiro.

Tabela 2. Estimativas dos contrastes (nematicida x concentrações do extrato aquoso) e significância para as variáveis altura (ALT), diâmetro caulinar (DC), massas das matérias secas da parte aérea (MMSPA) e das raízes (MMSR), avaliados no controle de *Meloidogyne javanica* no tomateiro.

CONTRASTES	ALT(cm)	DC(cm)	MMSPA(g)	MMSR(g)
10% X Nematicida	1.571 ^{ns}	-0.428 ^{ns}	1.195 ^{ns}	0.011 ^{ns}
20% X Nematicida	0.000 ^{ns}	0.000 ^{ns}	-2.674 ^{**}	-0.037 ^{ns}
30% X Nematicida	-3.714 ^{ns}	-0.428 ^{ns}	-4.771 ^{**}	0.051 ^{ns}
40% X Nematicida	-2.142 ^{ns}	0.142 ^{ns}	-4.841 ^{**}	0.245 ^{ns}

** - significativo a 1% ns- não significativo a 5%.

Para os números de galhas e de massas de ovos por planta e por grama de raízes, as equações de regressão apresentaram ajuste quadrático (Figura 4). Houve redução nos números de galhas e de massas de ovos nos tratamentos com extrato aquoso de sisal, em todas as concentrações, quando comparados com o tratamento sem extrato. Os resultados foram semelhantes àqueles obtidos no ensaio *in vitro* em que o extrato, nas diferentes concentrações, causou elevada taxa de mortalidade dos J2 (Figuras 4 e 5).

O extrato aquoso do sisal, em todas as concentrações, causou a redução nos números de galhas e de massas de ovos por planta, com valores variando de 26% até 46% e de 26% até 45%, respectivamente, quando comparados com o tratamento sem extrato (Figura 4).

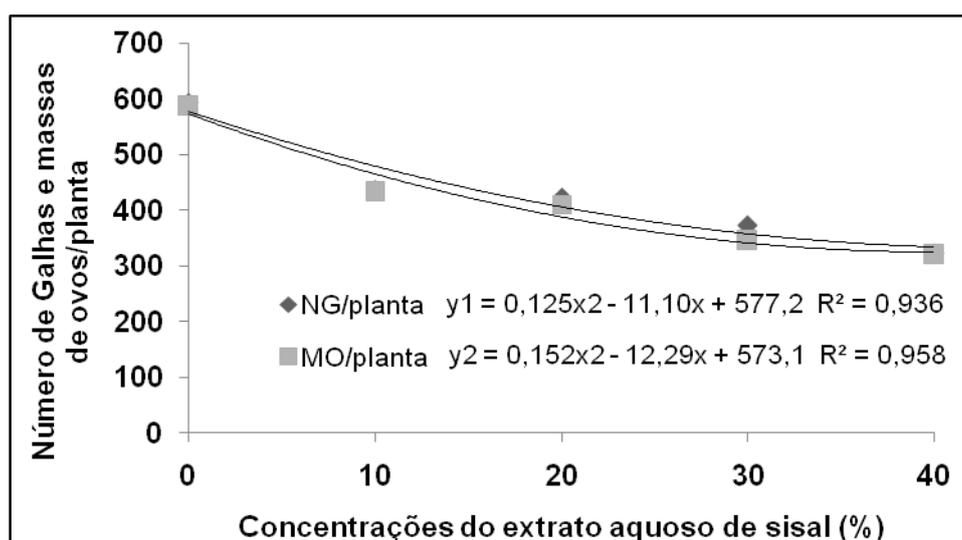


Figura 4. Números de galhas por planta (NG) e de massas de ovos (MO) por planta de tomateiros tratados com extrato aquoso proveniente do resíduo sólido seco e moído de sisal.

A redução nos números de galhas e de massas de ovos por grama de raízes

foi de até 37% e 39%, respectivamente, em relação ao tratamento sem extrato, não havendo diferença significativa entre as concentrações. As maiores reduções foram obtidas com concentrações de 30% e 40% (Figura 5).

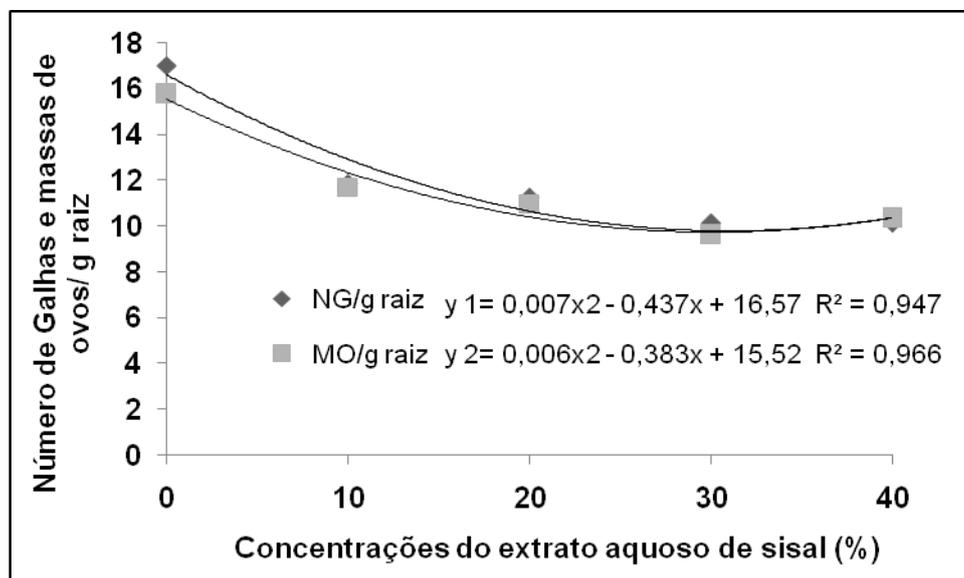


Figura 5. Números de galhas (NG) por grama de raízes e de massas de ovos (MO) por grama de raízes de tomateiros tratados com extrato aquoso proveniente do resíduo sólido seco e moído de sisal.

Entretanto, vale salientar que, nos tratamentos com 30% e 40%, houve efeito fitotóxico para as plantas. Provavelmente, a mesma substância que causou fitotoxicidade seja também responsável pelo controle do nematoide.

Costa et al. (2000) avaliaram a patogenicidade e a reprodução de *M. incognita* em tomateiros tratados com filtrados fúngicos, extratos de plantas e esterco animais. Observaram que o extrato obtido de *Coffea arabica* L. (cafeeiro) causou redução na biomassa da parte aérea, entretanto, reduziu o número de ovos. Segundo os autores, a mesma substância responsável pela redução do número de ovos pode ter causado toxidez ao tomateiro.

Não houve diferença entre as plantas tratadas com nematicida e com o extrato, nas concentrações de 30% e 40%, com relação aos números de galhas e de massas de ovos por planta. Entretanto, o nematicida foi superior ao extrato, nas concentrações iguais ou inferiores a 30%, para o número de galhas por planta. Para os números de galhas e de massas de ovos por grama de raízes, o nematicida foi superior ao extrato em todas as concentrações. Para as concentrações de 10% e 20% do extrato, observou-se que o nematicida

promoveu melhor resultado, com maior redução do número de massas de ovos por planta (Tabela 3).

Tabela 3: Estimativas dos contrastes (nematicida x concentrações do extrato aquoso do sisal) e significância para os variáveis (NG – Número de galhas e MO- Número de massas de ovos) avaliadas no controle de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro.

CONTRASTES	NG/planta	NG/g raiz	MO/planta	MO/g raiz
10% X Nematicida	188,571**	6,714**	210,285**	6,857**
20% X Nematicida	175,142**	5,710**	188,428**	6,142**
30% X Nematicida	122,428**	5,142**	123,142 ^{ns}	4,855**
40% X Nematicida	72,714 ^{ns}	4,857**	97,857 ^{ns}	5,857**

** - significativo a 1% ns- não significativo a 5%.

Em experimentos *in vitro*, Olabiyi et al. (2008) verificaram que os extratos aquosos de espinho-de-cristo (*Euphorbia hirta* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* L.) e fedegoso (*Cassia obtusifolia* L.) a 0,15 e 0,20 g mL⁻¹ ocasionaram até 100,0% de mortalidade de J2 de *M. incognita*. Em análises fitoquímicas nas plantas estudadas, os autores verificaram que estas possuem taninos, flavonoides, alcaloides, esteróis e glicosídeos que podem exercer atividade nematicida.

Dentre os fitoquímicos isolados do sisal, destacam-se ácidos graxos, esteroides, taninos, alcaloides, cumarinas, saponinas, compostos fenólicos, terpenos e flavonoides (FRANCIS et al., 2002; ZOU et al., 2006; CHEN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; BARRETO et al. 2010; BOTURA 2011).

Lakshmi et al. (2010) e Doligalska et al. (2011) descreveram sobre os efeitos antiparasitários de saponinas e flavonoides extraídos de plantas. Botura (2011) mencionou que o efeito das saponinas sobre a motilidade de juvenis de *Haemonchus contortus* em caprinos, pode estar associado à interação dessas substâncias com proteínas da cutícula do parasito ou à sua ação de desestabilização das membranas celulares e consequente aumento da permeabilidade celular.

Para Mello e Santos (2002), dentre as hipóteses sobre os mecanismos da ação antimicrobiana dos taninos, destacam-se a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e a complexação com íons metálicos com consequente diminuição da sua

disponibilidade para o metabolismo dos micro-organismos. A eficácia antiparasitária dos taninos parece estar associada a sua ação sobre as proteínas encontradas na cutícula, cavidade oral, esôfago, cloaca e vulva de nematoides, alterando suas propriedades físico-químicas (OLIVEIRA et al., 2009).

Olabiyi (2008) aplicou, via solo, os extratos aquosos obtidos a partir das raízes de *Tagetes erecta* L., *Hypis suaveolens* (Poit) e *Ocimum gratissimum* L. e avaliou o controle de *M. incognita*. O autor observou redução na taxa de reprodução e na infectividade deste nematoide e acredita que este resultado possa ser devido à presença de flavonoides nas raízes destas plantas. Ademola et al. (2004) relataram que a ação de metabólitos secundários, incluindo saponinas, flavonoides, taninos condensados e alcaloides de *Khaya senegalensis* A. Juss (mogno africano) inviabilizaram o desenvolvimento *in vitro* de juvenis de *H. contortus*.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos usando o extrato aquoso proveniente do resíduo seco do sisal no controle de nematoides de plantas. Assim, os resultados encontrados neste trabalho constituem o primeiro relato da ação deletéria de resíduos do sisal sobre um fitonematoide.

Avaliação do pó moído proveniente do resíduo sólido seco do sisal em casa de vegetação

Nas figuras 6A e 6B, observa-se que o modelo de regressão ajustado para a altura das plantas foi quadrático e para o diâmetro caulinar foi linear. Para ambas as variáveis, o aumento da dose do resíduo sólido seco e moído de sisal promoveu redução no crescimento dos tomateiros.

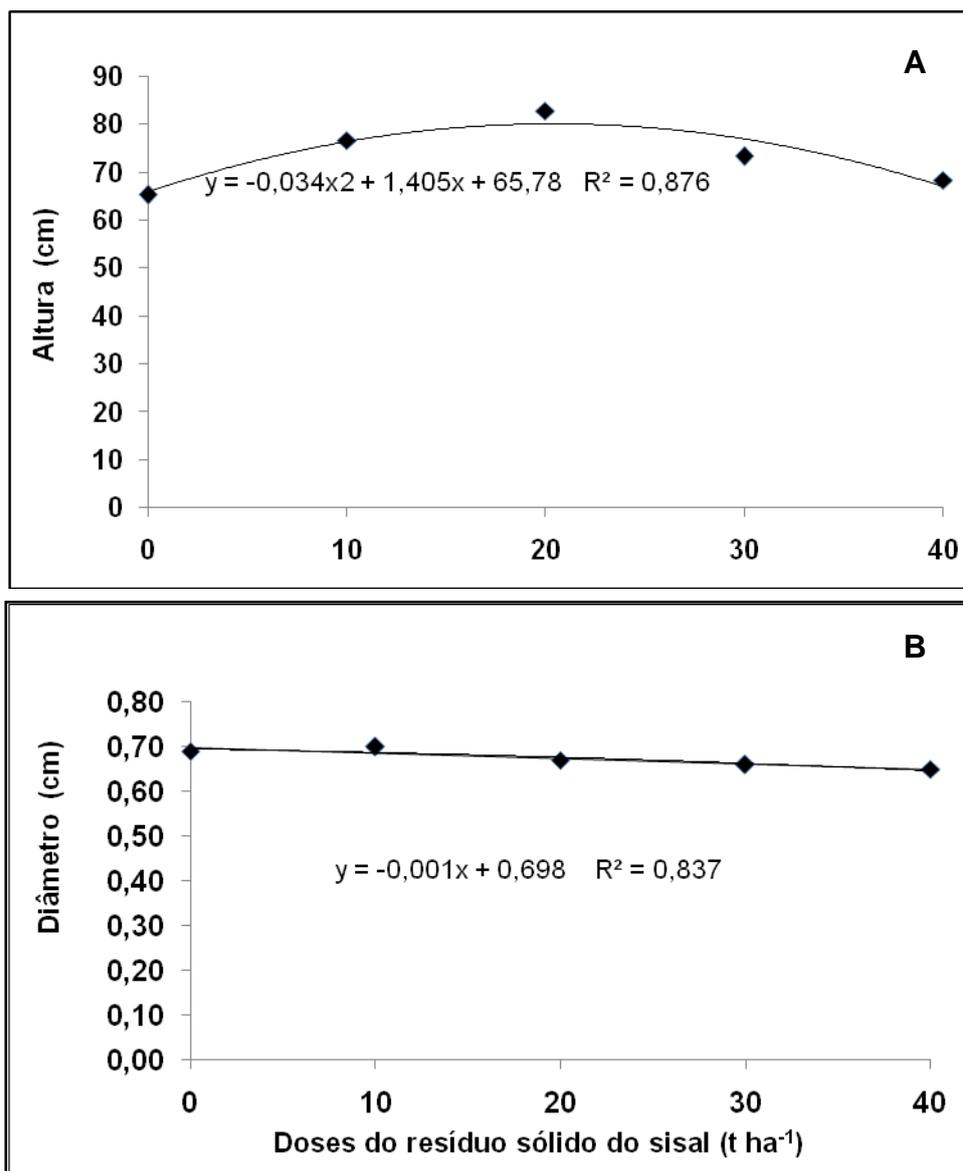


Figura 6. A) Altura e B) Diâmetro caulinar de tomateiros submetidos às doses do resíduo sólido seco e moído de sisal.

O aumento da dose do resíduo sólido seco de sisal causou a redução na massa da matéria seca da parte aérea, de forma linear, em até 24% (40 t ha⁻¹), em relação ao tratamento sem o resíduo (Figura 7A). Para a massa da matéria seca das raízes, a aplicação de 40 t ha⁻¹ causou efeito tóxico nas plantas, causando redução de 46% na biomassa em comparação ao tratamento sem o resíduo (0 t ha⁻¹) (Figura 7B).

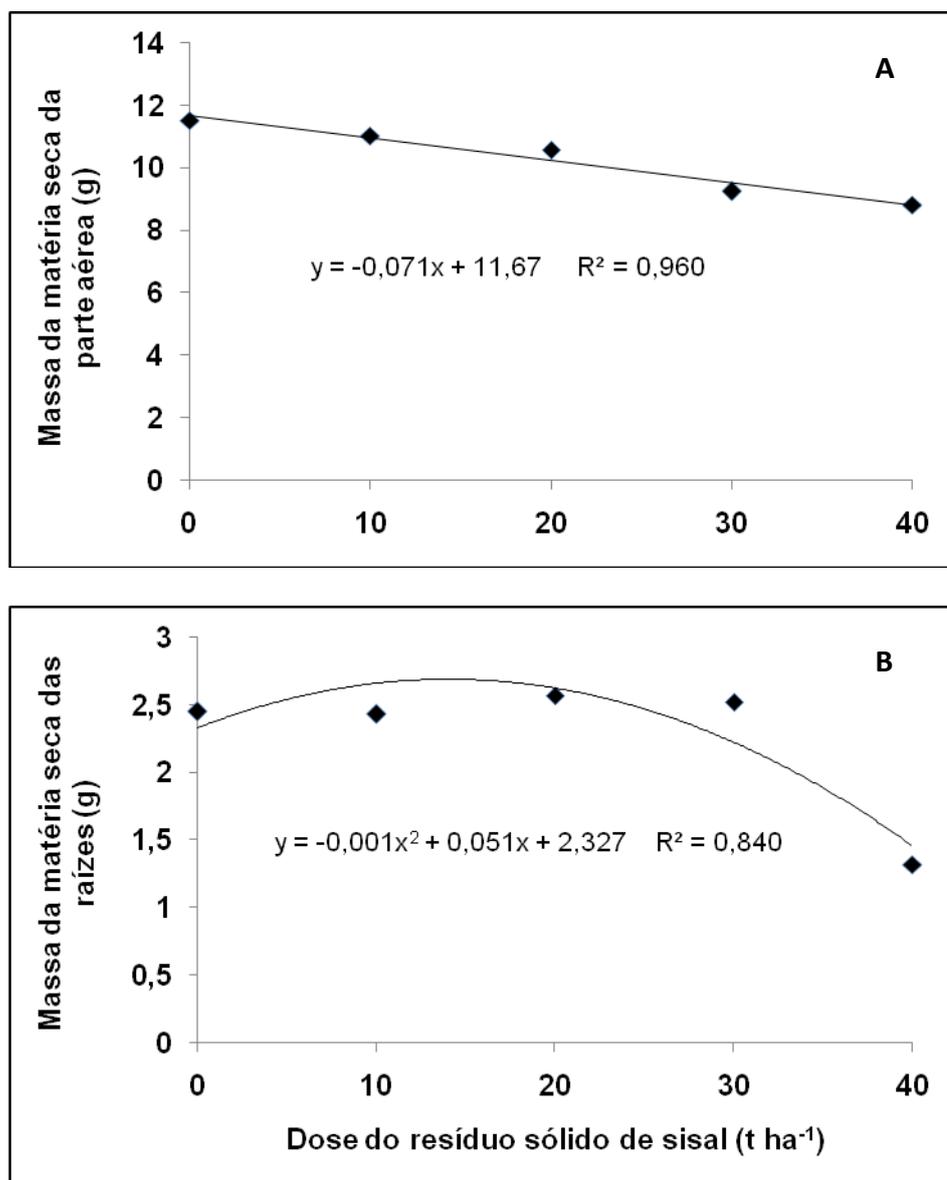


Figura 7. A) Massas das matérias secas da parte aérea e B) das raízes de tomateiros submetidos às doses do resíduo sólido seco e moído de sisal.

Ribeiro et al. (2012) testaram cinco doses do resíduo obtido da casca e polpa externa de pequi (0; 7,5; 15 e 30 g/por 4 kg de solo) no controle de *M. javanica* em tomateiro. Os autores verificaram que houve redução de 55% e de 52% na altura e na massa da matéria seca da parte aérea, respectivamente, com a dose de 30 g em relação à testemunha, indicando efeito de fitotoxicidade.

Avaliando os contrastes ortogonais, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com o resíduo sólido e seco de sisal e o

nematicida, em todas as doses, para a altura de plantas e o diâmetro caulinar. Para a massa da matéria seca da parte aérea, apenas a dose equivalente a 40 t ha⁻¹ diferiu do nematicida. Para a massa da matéria seca das raízes, todos os tratamentos diferiram do nematicida (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas dos contrastes (nematicida x doses do resíduo seco de sisal) e significância para as variáveis altura (ALT), diâmetro caulinar (DC), massas das matérias secas da parte aérea (MMSPA) e das raízes (MMSR) avaliados no controle de *Meloidogyne javanica* no tomateiro.

CONTRASTES	ALT (cm)	DC (cm)	MMSPA (g)	MMSR (g)
10 t ha ⁻¹ X Nematicida	-1,634 ^{ns}	0,076 ^{ns}	0,500 ^{ns}	0,469*
20 t ha ⁻¹ X Nematicida	2,519 ^{ns}	-0,230 ^{ns}	0,530 ^{ns}	0,758**
30 t ha ⁻¹ X Nematicida	1,519 ^{ns}	-0,307 ^{ns}	-1,264 ^{ns}	0,565*
40 t ha ⁻¹ X Nematicida	1,666 ^{ns}	-0,500 ^{ns}	-1,698*	-0,636**

** - significativo a 1% *- significativo a 5% ns - não significativo a 5%.

Houve redução nos valores das variáveis avaliadas para a maioria dos tratamentos. O modelo de regressão ajustado para a avaliação destas variáveis foi o quadrático. Para os números de galhas e de massas de ovos por planta e por grama de raízes, não houve diferença significativa entre o tratamento sem o resíduo e com resíduo na dose equivalente a 10 t ha⁻¹. Estes dados indicam que a quantidade de resíduo de sisal aplicada não foi suficiente para promover o efeito nematicida (Figuras 8 e 9).

Os tratamentos com 20, 30 e 40 t ha⁻¹ causaram redução significativa nos números de galhas por planta em 51%, 37% e 36%, respectivamente. Em relação ao número de massas de ovos por planta, os tratamentos com 20, 30 e 40 t ha⁻¹ de resíduo sólido e seco de sisal não diferenciaram entre si, causando a redução de 58%, 46% e 48%, respectivamente, quando comparados com o tratamento sem o resíduo (Figura 8).

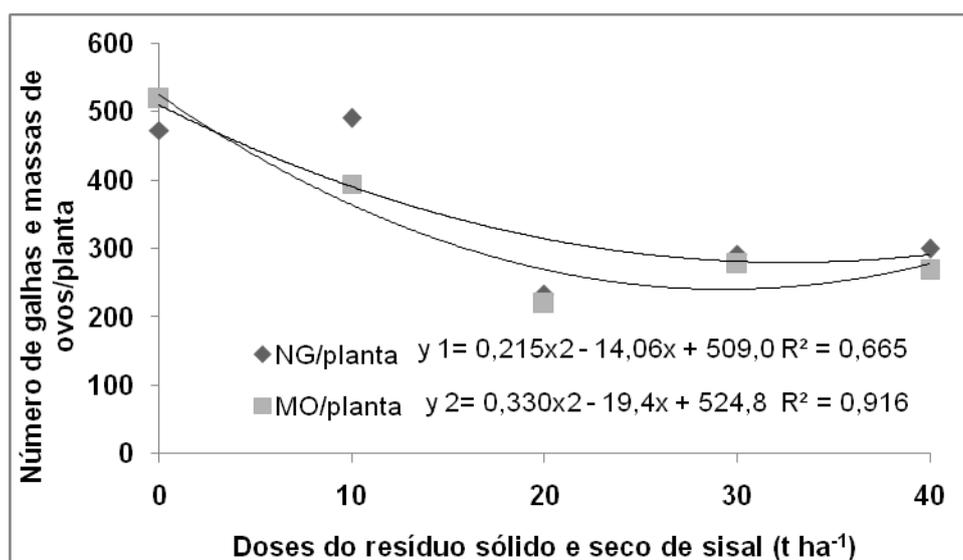


Figura 8. Números de galhas (NG) por planta e de massas de ovos (MO) por planta em raízes de tomateiros submetidos às doses do resíduo sólido seco de sisal.

Para os números de galhas e de massas de ovos por grama de raízes, a aplicação de 20 t ha⁻¹ de resíduo seco de sisal causou reduções em 42% e 39%, respectivamente, quando comparadas com o tratamento sem a aplicação do resíduo (Figura 9).

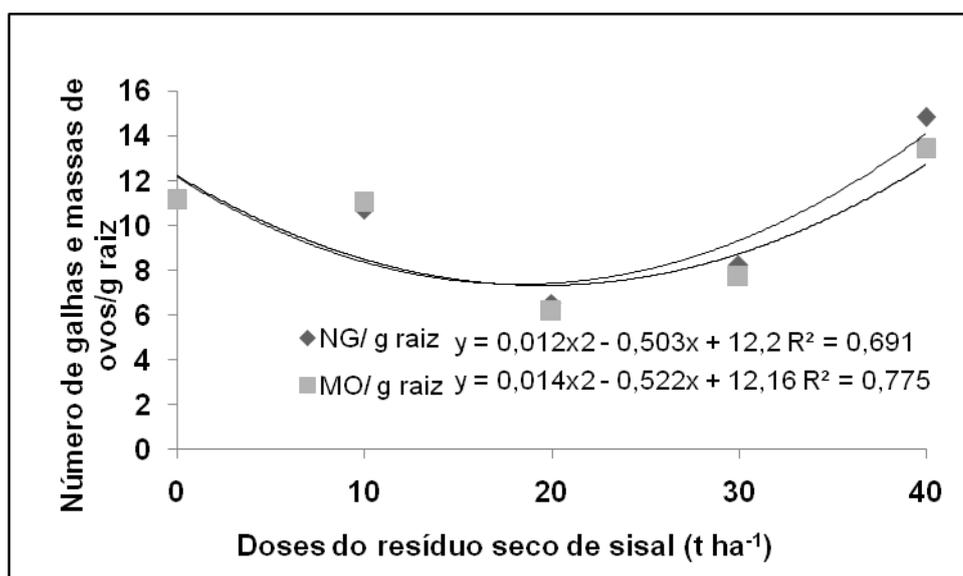


Figura 9. Números de galhas (NG) por grama de raízes e de massas de ovos (MO) por grama de raízes de tomateiros submetidos às doses do resíduo sólido seco de sisal

Embora a aplicação de 20 t ha⁻¹ do pó moído obtido do resíduo sólido seco do sisal tenha promovido os melhores resultados no crescimento do tomateiro e no controle dos nematoides, o tratamento com o nematicida proporcionou a maior redução nos números de galhas e de massas de ovos nas raízes dos tomateiros. Comparando-se os tratamentos com a aplicação de nematicida e do pó moído do resíduo seco, observa-se que houve diferença entre ambos para as variáveis avaliadas em todas as doses. Entretanto, para os números de galhas e de massas de ovos por grama de raízes, somente o tratamento com a aplicação de 20 t ha⁻¹ de resíduo seco não diferiu do tratamento com o nematicida (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativas dos contrastes (nematicida x doses do resíduo seco de sisal) e significância para as variáveis (NG – Número de galhas e MO – Massas de ovos) no controle de *Meloidogyne javanica* avaliados em raízes de tomateiro.

CONTRASTES	NG/planta	NG/g raiz	MO/planta	MO/g raiz
10 t ha ⁻¹ X Nematicida	404,237**	11,025**	443,493**	12,083**
20 t ha ⁻¹ X Nematicida	127,930**	3,87 ^{ns}	144,570**	4,237 ^{ns}
30 t ha ⁻¹ X Nematicida	193,083**	5,564*	202,339**	5,775*
40 t ha ⁻¹ X Nematicida	194,000**	12,166**	193,500**	10,500**

** - significativo a 1% *- significativo a 5% ns - não significativo a 5%.

Ribeiro et al. (2012) observaram que, com o aumento das doses, a aplicação do material obtido pela moagem da casca e polpa externa de pequi reduziu os números de galhas, de massas de ovos e de ovos de *M. javanica* no sistema radicular de tomateiros.

O tratamento com 20 t ha⁻¹ de resíduo de sisal promoveu o melhor resultado no controle dos nematoides e não diferiu da testemunha quanto ao desenvolvimento da parte aérea e da massa da matéria seca das plantas (Figuras 6 e 7). Lopes et al. (2005) avaliaram os números de galhas e de ovos, a altura e a massa da matéria seca de tomateiros infectados por *M. incognita* e *M. javanica*, após a aplicação, no solo, de extratos de mucuna-preta e obtiveram resultados positivos somente na redução de galhas e de número de ovos, não sendo observada diferença estatística quanto ao desenvolvimento da parte aérea e da massa de matéria seca da cultura.

Em avaliação de outras aplicações de resíduos de Agave na agricultura, Potenza et al. (2006) verificaram que extratos aquosos de *A. angustifolia* promoveram redução significativa da população de *Tetranychus urticae*, comumente chamado de ácaro rajado, em algodão. Os autores obtiveram até 76,3% de eficiência no controle da praga.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a utilização do resíduo seco do sisal em quantidades excessivas (40 t ha^{-1}) provocou efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento da cultura. Isto foi constatado pelas menores massas de matérias secas da parte aérea e das raízes e pelo amarelecimento das mudas, logo após o transplante, que apresentaram desenvolvimento inferior às das demais tratamentos. Sugere-se que a quantidade dos compostos secundários presentes no resíduo seco de sisal, principalmente, taninos, fenóis e flavonoides foram elevados quando comparados com os tratamentos que receberam doses menores, por exemplo, 20 t ha^{-1} , e causaram este efeito fitotóxico. Além disso, naquela dose, pode ter havido redução na absorção de vários nutrientes.

Segundo Moreira e Siqueira (2002), compostos aromáticos, como taninos que estão presentes na composição do sisal, causam a redução da absorção de vários nutrientes como nitrogênio e fósforo e promovem a interação com enzimas e substâncias promotoras de crescimento, aumentam a absorção de ferro e de outros micronutrientes, e alteram as relações hídricas entre a planta e o solo. Os ácidos fenólicos são mencionados como responsáveis pela redução de absorção de micro e macronutrientes em diversas espécies. Os flavonoides também interferem de maneira indireta na absorção de nutrientes pelas plantas (SANTOS e REZENDE 2008).

Estes compostos podem, de forma indireta, influenciar alterações nas características nutricionais da planta e na atividade dos micro-organismos no solo (RICE, 1984; RIZVI et al. 1992 citados por BORELLA et al., 2009).

Mian e Rodríguez-Kábana (1982) trataram o solo infestado com *M. arenaria* com os seguintes compostos ricos em taninos e fenóis: ácido tanínico, pó de café, folhas de azevinho (*Ilex opaca* Ait.) e cascas de nozes de pecan (*Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch). Após três semanas, foi feito o plantio de abobrinha e foram avaliados o desenvolvimento da planta e o número de galhas. Os autores verificaram que os compostos reduziram o número de galhas e o tratamento com

ácido tanínico reduziu a população de *M. arenaria*, mas, obsevaram, também, severa fitotoxicidade nas plantas de abobrinha (*Curcubita pepo* L.). Estes compostos fenólicos ocorrem naturalmente no solo, sendo liberados pelas raízes. Porém, a fitotoxicidade destas substâncias é reduzida pela atividade microbiana (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

No presente trabalho, o transplântio do tomateiro foi efetuado dez dias após a incorporação do resíduo ao substrato. Possivelmente, não tenha havido tempo suficiente para a decomposição do resíduo pelos micro-organismos. A eficiência em controlar nematoides-das-galhas com tortas aumenta e o risco de fitotoxidez reduz com maior intervalo de tempo entre a aplicação e o plantio (HOSSAIN et al., 1992). Jain e Bhatti (1988) verificaram que o crescimento de tomateiros e o controle de nematoides foram maiores quando as folhas de nim (*Azadirachta indica*) foram incorporadas ao solo seis semanas antes do plantio.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos relatando a utilização do resíduo seco e moído de sisal no controle de *M. javanica* no tomateiro. Fazem-se necessárias novas pesquisas para determinar o teor de saponinas, taninos e outros metabólitos presentes no resíduo sólido seco de sisal e avaliar os mecanismos de ação sobre o desenvolvimento dos nematoides também em condições de campo. Sugere-se, portanto, que o intervalo entre a aplicação do resíduo sólido seco de sisal e o plantio da cultura seja superior a dez dias e que são necessários mais trabalhos para definir o período adequado para se estabelecer a cultura, evitando, assim, riscos de fitotoxicidade.

CONCLUSÕES

1. O extrato aquoso de sisal tem efeito nematicida sob condições *in vitro* e a concentração de 30% controlou 96% dos nematoides;
2. O extrato aquoso do sisal foi capaz de controlar *M. javanica*, com redução no número de galhas e de massas de ovos nas plantas;
3. A aplicação de do extrato aquoso do sisal nas concentrações de 30% e de 40% tem efeito fitotóxico ao tomateiro;
4. A aplicação de 20 t ha⁻¹ do resíduo seco de sisal controla o nematoide-das-galhas sob condições de casa-de-vegetação;

5. A aplicação de 40 t ha⁻¹ do resíduo seco causou fitotoxicidade no tomateiro até dez dias após aplicado e misturado ao solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 151-164, 2004.

BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (Ed.). **O sisal do Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília: APEX, 2006. p.58-61.

BARRÊTO, A.F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B.F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 207-215, 2010.

BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 533, 1981.

BORELLA, J.; WANDSCHEEN, A.C.D.; BONATTI, L.C.; PASTORINI, L.H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, p. 260-265, 2009.

BOTURA, M. **Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana* perr. (sisal) sobre nematoides gastrintestinais de caprinos**. 2011. 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2011.

BOTURA, M.B.; SILVA, G.D.; LIMA H.G.; OLIVEIRA, J.V.A.; SOUZA, T.S.; SANTOS J.D.G.; BRANCO, A.; MOREIRA, E.L.T.; ALMEIDA, M.A.O. .

BATATINHA, M.J.M. *In vivo* anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v.177, p. 104-110, 2011.

BRANDÃO, L.G.N.; PEREIRA, L.G.R.; AZEVEDO, J.A.G.; SANTOS, R.D.; ARAGÃO, A.S.L.; VOLTOLINI, T.V.; NEVES, A.L.A.; ARAÚJO, G.G.L.; BRANDÃO, W.N. Valor nutricional de componentes da planta e dos coprodutos da *Agave sisalana* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.63, p.1493-1501, 2011.

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

CHEN, P.Y.; KUO, Y.C.; CHEN, C.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**, v.14, p.1789-1795, 2009.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, v. 24, p. 219-226, 2000.

DOLIGALSKA, M.; JÓZWICKA, K. ; KIERSNOWSKA, M.; MROCZEK, A.; PAÇKOWSKI, C.; JANISZOWSKA, W. Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free living stages of *Heligmosomoides bakeri*. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.144-151, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

FARIA, M.M.S.; JAEGER, S.M.P.L.; OLIVEIRA, G.J.C.; OLIVEIRA, R.L.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, F.S. Composição bromatológica do coproduto do desfibramento

do sisal tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p. 337-382, 2008.

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

FERREIRA DF. 2011. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042, 2011.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587-605, 2002.

GARCÍA, M.D; QUÍLEZ A.M.; SÁENZ, M.T.; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ; M.E.; PUETA R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal de Ethno pharmacology**, v. 71, p.395-400, 1999.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.42, p. 370-375, 2009.

HOSSAIN, M.S.; ZAHID, M.I.; MILAN, I.H. Effect of decomposition period on the efficacy of two oil cakes for control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Japanese Journal of Nematology**, v. 22, p. 1-10, 1992.

JAIN, R.K.; BHATTI, D.S. Effect of degradation of neem leaves on incidence of root knot nematode in tomato transplants. **Indian Journal of Nematology**, v. 8, p.19-24, 1988.

JESUS, F.N.; DAMASCENO, J.C.A.; SOARES, A.C.F. Controle orgânico de nematóides do solo com resíduo de *Agave sisalana* Perrine. In: **I Reunião Nordestina de Ciência do Solo**, 2013, Paraíba. I Reunião Nordestina de Ciência do Solo, 2013.

LAKSHMI, V. LAKSHMI, V.; JOSEPH, S.K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, S.K.; SAHOO, M.K.; DUBE, V.; MISHRA, S.K.; MURTHY, P.K. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malay*. **Acta Tropica**, v.116, p.127-133, 2010.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.A.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjerição sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 67-74, 2005.

MAISTRELLO, L.; VACCARI, G.; SASANELLI, N. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Helminthologica**, v. 47, p. 48-57, 2010.

MELLO, C. P. SANTOS, S. C. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 950 p.

MIAN, I.H.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Organic amendments with tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. **Nematropica**, v. 12, p. 221-234, 1982.

MORAIS, M.S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A.C.; BELÉM, L.F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 89-98, 2010.

MOREIRA, F.M.S.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 629p. 2002.

NASU, E.G.C.; PIRES, E.; FORMENTINI, H.M.; FURLANETTO, C. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios *in vitro* e em tomateiros em casa de vegetação. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 32-36, 2010.

OLABIYI, T.I.; OYEDUNMADE, E.E.A.; IBIKUNLE, G.L.; OJO, O.A., ADESINA, G.O.; ADELASOYE, K.A.; OGUNNIRAN, T.A. Chemical composition and bio-nematicidal potencial of some weed extracts on *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. **Plant Sciences Research**, v. 1, p. 30-35, 2008.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; BARROS, R.S.; RODRIGUES, A.C.M.; CAMURCA VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; LIMA, Y.C.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59, 2009.

POTENZA, M.R.; GOMES, R.C.O.; JOCYS, T.; TAKEMATSU, A.P.; RAMOS, A.C.O. Avaliação de produtos naturais para o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) em casa de vegetação. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, p.455-459, 2006.

REGAIEG, H.; CIANCIO, A.; RAOUANI, N. H.; GRASSO, G.; ROSSO, L. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2285–2289, 2010.

RIBEIRO, H.B.; RIBEIRO, R.C.F.; XAVIER, A.A.; CAMPOS, V.P.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; MIZOBUTSI, E.H. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematóide das galhas em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 453-458, 2012.

SANTOS, J.F.; SOUSA, C.S; SOARES, A.C.F.; LIMA, F.S. Efeito nematicida de extratos de resíduos orgânicos sobre *Scutellonema bradys*. In: **XXXV CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**, 2012, Jaguariúna SP.

SANTOS, S.; REZENDE, M.O.O. Avaliação do potencial herbicida de compostos secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens. **Revista Analytica**, v. 2, p. 32, 2008.

SECTI. Projeto Sisal de Base Tecnológica. Disponível em: <http://www.secti.ba.gov.br/wp-content/uploads/2013/01/PROJETO-SISAL-DE-BASE-TECNOLOGICA.pdf>. Acesso em 05 jan. 2014.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E.M. (Eds.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa SPI; Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1999. p. 205.

SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do Sisal**. In: Sistemas de Produção. CNPA/Embrapa Algodão. Versão Eletrônica, Dez./2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/index.html...>>. Acesso em: 07 jan 2014.

SILVEIRA, R.X. **Influência do resíduo líquido do sisal (*Agave sisalana* Perrine) sobre o desenvolvimento, *in vitro*, de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos**. 2009. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SOARES, A.C.F ; DAMASCENO, J.C.A . Control of *Meloidogyne javanica* in lettuce plants with sisal (*Agave sisalana*) liquid waste. In: III Congreso Latinoamericano de Agroecología: Para alcanzar la soberanía alimentaria en un planeta en crisis ambiental, energética y climática, Mexico, 2011.

SOUZA, M.F. **Atividade inseticida de extratos obtidos a partir do resíduo líquido de *Agave sisalana* Perrine no controle da praga *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae) em milho**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA. 2009.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. Cultivo de Sisal na região Semi-árida do nordeste brasileiro. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, v.5, 42p, 2006.

ZOU, P.; FU, J.; YU, H.S.; ZHANG, J.; KANG, L.P.; MA, B.P.; YAN, X.Z. The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.44, n.12, p.1090-1095, 2006.

CAPÍTULO 3

RESÍDUO LÍQUIDO DO DESFIBRAMENTO DE FOLHAS DE SISAL NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO¹

¹ Artigo ajustado e encaminhado ao comitê editorial do Periódico Horticultura Brasileira

Resíduo líquido do desfibramento de folhas de sisal no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro

Josilda C A Damasceno; Fábio N Jesus; Rosane da S Sant'ana, Ana Cristina F Soares

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do resíduo líquido (fresco ou fermentado) de sisal no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Foram conduzidos bioensaios *in vitro* com 100 µL de suspensão aquosa contendo 300 juvenis (J2) de *M. javanica* e 1000 µL de resíduo líquido. Os tratamentos consistiram do resíduo líquido fresco ou fermentado, nas concentrações de 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5%, 15,0%, 17,5% e 20,0%, o controle sem resíduo e o nematicida Carbofuran a 50 mg i.a.L⁻¹, com a imersão dos J2 nestes tratamentos, por 24 e 48 horas. Em casa de vegetação, 4000 juvenis de *M. javanica* foram inoculados em plantas de tomateiro e, após uma semana foram vertidos na base da planta 100 mL do resíduo líquido de sisal nas concentrações de 0,0%, 4,0%, 8,0%, 12,0%, 16,0% e 20,0%, além da água destilada e o nematicida Carbofuran a 0,50 g por vaso, como testemunhas. Foram analisados o crescimento vegetativo e o dano nas raízes. Avaliou-se a seletividade do resíduo do sisal sobre micro-organismos benéficos do solo. Todas as concentrações do resíduo apresentaram efeito nematicida nos testes *in vitro*, após 48 horas de exposição dos nematoides, ocorrendo até 100,0% de mortalidade dos juvenis de *M. javanica* na concentração de 20%. O aumento das concentrações do resíduo fresco ou fermentado reduziu o número de galhas e massas de ovos por planta e por grama de raízes e também a população final de *M. javanica* no solo. Houve crescimento dos micro-organismos benéficos nos tratamentos com resíduo fresco de sisal, para todas as concentrações avaliadas. O resíduo fermentado inibiu o crescimento de micro-organismos benéficos do solo. Estudos futuros serão conduzidos visando comprovar a ação nematicida deste resíduo no controle de *M. javanica* em tomateiro a campo.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, nematoide-das-galhas.

ABSTRACT

Sisal leaf decortication liquid residue for controlling of *Meloidogyne javanica* in tomato plants

This study aimed to evaluate the effect of sisal liquid residue (fresh or fermented) in controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato plants. *In vitro* bioassays were conducted with 100 μ L of an aqueous suspension containing 300 juveniles (J2) of *M. javanica* and 1000 μ L of sisal liquid residue. The treatments consisted of nematode immersion for 24 and 48 hrs in sisal liquid residue, fresh or fermented, diluted in water to the final concentrations of 0.0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5%, 15.0%, 17.5% and 20.0%, and nematicide Carbofuran at 50 mg a.i.l⁻¹. Under greenhouse conditions, 4000 juveniles of *M. javanica* were inoculated in tomato plants grown in pots, and after one week, 100 mL of sisal liquid residue at concentrations of 0.0%, 4.0%, 8.0%, 12.0%, 16.0% and 20.0%, were added to soil around the tomato plants. Control treatments received either 100 mL of distilled water or 0.50 g of Carbofuran per pot. Forty days after inoculation, plants were harvested and evaluated for plant growth and level of nematode damage. In addition, the selective effect of sisal liquid residue on growth of beneficial soil microorganisms was evaluated. All concentrations of sisal liquid residue presented nematocidal effect, after 48 hrs of nematode exposure. A mortality rate of 100.0% was obtained for *M. javanica* juveniles exposed to liquid residue at a concentration of 20.0%. Application of increasing concentrations of both sisal liquid residues reduced the number of galls and egg masses per plant and per gram of roots, as well as the final population of *M. javanica* in soil. Growth of beneficial soil microorganisms was observed in soil amended with sisal fresh liquid residue, for all concentrations tested. The fermented residue caused inhibition of soil beneficial microorganisms. Future studies should be conducted to test the nematocidal effect in tomato plants under field conditions.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, root-knot nematode.

INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, estão entre os principais patógenos da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Plantas sob ataque severo apresentam redução do tamanho e da eficiência do sistema radicular funcional (Cantu *et al.*, 2009).

O controle de fitonematóides é uma tarefa difícil, principalmente pelas limitações que a maioria dos métodos apresentam. O controle químico com o uso de nematicidas causa danos ao ambiente e ao homem e a rotação de cultura para espécies do gênero *Meloidogyne* é muito difícil devido à ampla gama de hospedeiros que o gênero possui. O uso de variedades resistentes, apesar de desejável, é limitado devido à escassez de cultivares resistentes e a quebra de resistência em temperaturas elevadas (Neves *et al.*, 2008).

Compostos de origem vegetal podem se constituir em importantes agentes de controle de pragas e micro-organismos patogênicos, pela fácil obtenção e utilização, baixo custo e por causarem menor impacto ao ambiente, quando comparados aos produtos químicos sintéticos (Morais *et al.*, 2009). Neste contexto, o resíduo líquido do desfibramento da folha de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) representa mais uma alternativa para os produtores, além de ter baixo custo e sem riscos de contaminação do ambiente.

O sisal, planta originária do México, se adaptou bem em regiões do Semiárido Nordestino, sendo a principal base de subsistência econômica de grande parte das famílias de municípios no semiárido da Bahia. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial da fibra de sisal e, em 2011, a Bahia foi responsável por 95,5% da produção de sisal no Brasil (CONAB 2013). A fibra de sisal representa somente 3,0 a 5,0% da folha e os resíduos sólidos e aquosos constituem os restantes, sendo 15,0% de mucilagem ou polpa, 1,0% de bucha (fibras curtas) e 81,0% de resíduo líquido (Suinaga *et al.*, 2006), que são abandonados nas propriedades rurais, sem qualquer aproveitamento.

O resíduo líquido do sisal tem como principais constituintes, a partir do metabolismo secundário, alcaloides, compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, flavonoides e taninos (Barreto *et al.*, 2010; Botura *et al.*, 2013).

Estas substâncias estão relacionadas, principalmente, ao mecanismo de defesa das plantas, e podem apresentar efeito inibitório contra fitonematoides (Chitwood, 2002). Em plantas do gênero *Agave*, foram constatadas ações biocidas com relação à nematoides em caprinos e ovinos (Domingues *et al.*, 2010; Botura *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2012; Botura *et al.*, 2013), ácaros (Barreto *et al.*, 2010) e fungos (Guleria & Kumar, 2009).

As atividades biológicas das saponinas estão relacionadas com sua capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios das membranas, o que pode ocasionar a desestabilização das mesmas e consequente aumento da permeabilidade celular (Schenkel *et al.*, 2010). A ação dos flavonoides sobre parasitos tem sido associada às alterações na atividade de várias enzimas ou nos processos metabólicos (Kerboeuf *et al.*, 2008).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do resíduo líquido do sisal (fresco ou fermentado), no controle de *Meloidogyne javanica*, sob condições *in vitro* e em casa de vegetação, na cultura do tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Os ovos dos nematoides foram extraídos de raízes de tomateiro, mantidas em casa de vegetação, pelo método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981). A suspensão de ovos/juvenis foi calibrada em câmara de contagem (lâmina de Peters) com o auxílio de microscópio estereoscópio.

Obtenção do resíduo líquido de sisal

O resíduo líquido fresco foi obtido durante o processo de desfibramento das folhas de sisal, em propriedade rural localizada no município de Valente, BA e transportado, sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, onde foi filtrado por três vezes em peneira de 400 mesh e,

mantido em freezer a -4°C , até a utilização nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Para o resíduo fermentado, preparou-se uma mistura de resíduo líquido fresco e água na proporção de 1:1 (v:v), sendo esta mistura mantida por quatro dias em recipiente plástico fechado, sem agitação. Após este período, a mistura foi filtrada em peneira de 400 mesh. Os resíduos fresco e fermentado apresentaram pH 5,0 e 9,0, respectivamente, e ambos foram ajustados com NaOH (10%) e HCl (1%) para 6,5.

Resíduo líquido de sisal no controle *in vitro* de *Meloidogyne javanica*

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, seguindo-se o delineamento inteiramente ao acaso com dez tratamentos e oito repetições. Cada bioensaio conduzido em tubo de microcentrífuga foi considerado como uma parcela.

Foram instalados bioensaios utilizando 100 μL de suspensão aquosa contendo 300 J2 de *M. javanica* e 1000 μL de resíduo líquido (fresco ou fermentado) de sisal, em tubos de microcentrífuga. Utilizaram-se as seguintes concentrações: 0,0% (sem resíduo), 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0%, 12,5%, 15,0%, 17,5% e 20,0% de resíduo líquido diluído em água destilada esterilizada (concentrações definidas por testes preliminares) e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) a 50 mg i.a.L⁻¹, conforme Nassu *et al.* (2010) .

Os tubos com os bioensaios foram incubados a 28°C , em câmara de crescimento tipo BOD e, após 24 e 48 horas, os nematoides foram retirados dessa suspensão, lavados com água esterilizada, realizando-se a contagem dos indivíduos imóveis em câmara de Peters. Após a contagem, os nematoides foram colocados em água por mais 24 horas, sendo em seguida, adicionada uma gota de solução aquosa de hidróxido de sódio (1,0 M) em cada tubo e contados os indivíduos, sendo os retos e imóveis considerados mortos, enquanto os retorcidos ou móveis foram considerados vivos. Os dados foram transformados em $\arcsen(x/100)^{0,5}$ e submetidos à análise de variância e de regressão. Fez-se também a análise de contrastes ortogonais comparando as concentrações do resíduo e o nematicida.

Controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro com resíduo líquido de sisal

Em casa de vegetação, foi instalado o ensaio com resíduo fresco ou fermentado. Foi utilizada uma mistura esterilizada de solo e areia na proporção de 1:1, em vasos com capacidade para 2 litros. Fez-se o transplântio de mudas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada, com 20 dias de germinadas em substrato Vivatto Slim[®], deixando-se uma muda por vaso e, sete dias após o transplântio, as mudas foram inoculadas com 4000 J2 de *M. javanica*. Uma semana após a inoculação, foram vertidos na base da planta 100 mL de resíduo líquido de sisal fresco ou fermentado.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial $2 \times 6 + 2$ (resíduos fresco e fermentado x concentrações do resíduo) e dois tratamentos testemunha (água destilada e o nematicida), com 15 repetições. Cada vaso com uma planta foi considerado uma parcela experimental. Os vasos receberam os tratamentos com o resíduo líquido do sisal diluído em água a 0% (sem resíduo), 4,0%, 8,0%, 12,0%, 16,0% e 20,0%, além de água destilada e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) na dose de 0,50 g por vaso, seguindo o trabalho de Nassu *et al.* (2010), com modificações. Estes autores utilizaram 2,0 g por vaso, o que causou fitotoxicidade no tomateiro e, por este motivo, a dose foi reduzida para 0,50 g, após testes preliminares realizados em plantas de tomateiro.

Quarenta dias após a inoculação, as plantas de tomateiro foram coletadas e avaliadas quanto à altura, diâmetro caulinar, massas secas da parte aérea e das raízes, números de galhas e de massa de ovos nas raízes. Para a contagem dos números de massas de ovos e de galhas, amostras de raízes frescas foram separadas e coloridas por imersão em solução de fucsina ácida a 0,15%, durante 20 minutos. O número total de nematóides presentes no solo de cada parcela (População final= Pf) foi obtido por meio da multiplicação do número de nematóides presentes em 100 mL de solo por vinte, para estimar em 2 L. A partir destes dados calcularam-se os fatores de reprodução (FR= Pf/Pi) (Oostenbrink, 1966).

Os dados foram submetidos às análises de variância e de regressão em função das concentrações do resíduo. Fez-se também a análise de contrastes ortogonais comparando as concentrações do resíduo e o nematicida. Para estas análises foi utilizado o pacote estatístico SISVAR versão 5.3 Build 77. Todos os experimentos foram repetidos.

Seletividade de resíduo líquido de sisal a micro-organismos benéficos

Foi avaliado o efeito do resíduo do sisal fresco ou fermentado sobre o crescimento dos micro-organismos benéficos do solo. Os resíduos, depois de filtrados, foram esterilizados, por 40 minutos, sob luz UV, em câmara de fluxo laminar. Foram utilizados os seguintes micro-organismos: *Penicillium citrinum*, *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, além de 10 isolados de actinobactérias codificados como BFT 4, BFT 7, BFT 11, BFT 41, BFT 71, BFT 87, BFT 88, BFT 102, BFT 106 e PD3. Estes micro-organismos foram selecionados com base nos trabalhos de biocontrole de *Aspergillus niger* e *M. javanica* (Sá, 2013; Damasceno, 2011; Damasceno *et al.*, 2012), provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB.

Os micro-organismos foram multiplicados em meios de cultura específicos para o crescimento dos mesmos. Os meios de cultura CYA, TSM modificado (0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,9 g de KH₂PO₄; 0,15 g de KCl; 1 g de NH₄NO₃; 3 g de dextrose; 0,15 g de rosa de bengala; 3 mL de Triton X100; 0,25 g cloranfenicol, 0,1 mg de Carbendazin, 15 g Agar) e Czapeck Dox foram preparados conforme as recomendações do fabricante. Reduziu-se a quantidade de água adicionada aos meios de cultura, de acordo com o volume de resíduo que seria adicionada posteriormente.

As diferentes concentrações do resíduo fresco ou fermentado (4,0%, 8,0%, 12,0%, 16,0% e 20,0%) foram adicionadas aos meios de cultura, após a esterilização do meio em autoclave, quando estes apresentavam temperatura próxima ao ponto de solidificação do ágar (aproximadamente, 50°C). Em seguida os meios foram cuidadosamente agitados, com movimentos circulatorios, para homogeneização e, então, transferidos para placas de Petri. Foram acrescentados 100 µg/mL de ciclohexamida ao meio Czapeck Dox para

inibição do crescimento de fungos. No tratamento controle, foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição do resíduo. As culturas dos micro-organismos foram repicadas para as placas e incubadas à temperatura ambiente (28°C) por um período de 5 a 10 dias. Avaliou-se a presença ou ausência de crescimento de micro-organismo no meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resíduo líquido de sisal no controle *in vitro* de *Meloidogyne javanica*

Os resíduos líquidos de sisal, fresco ou fermentado, reduziram a mobilidade e causaram a mortalidade de J2 de *M. javanica*. A imobilidade dos juvenis, após 24 horas de exposição, aumentou linearmente com as crescentes concentrações de ambos os resíduos. Foram alcançados valores de até 97,3% e 85,1% de imobilidade de *M. javanica*, na concentração a 20,0% do resíduo fresco ou fermentado, respectivamente, em relação ao tratamento controle sem resíduo (Figura 1 A).

Após 48 horas de exposição dos J2 de *M. javanica* aos tratamentos, foi comprovado o efeito nematicida do resíduo, para todas as concentrações testadas, uma vez que os nematoides, quando transferidos para água, não retomaram a mobilidade. A taxa de mortalidade dos J2 de *M. javanica* expostos aos resíduos por 48 horas aumentou à medida que aumentaram as concentrações. A mortalidade variou de 90,8% a 100,0% e de 95,0% a 100%, nas concentrações entre 2,5% e 20,0% de resíduo fresco ou fermentado, respectivamente (Figura 1 B). O nematicida causou 99,8% de mortalidade após a exposição dos nematoides por 48 horas, não diferindo estatisticamente dos valores observados para ambos os resíduos nas concentrações de 17,5% e 20,0% .

O período de 48 horas se apresentou como o tempo adequado para exposição dos J2 de *M. javanica* aos resíduos e ao nematicida comercial para que haja um controle eficiente destes nematoides. Ensaios preliminares (dados não apresentados) indicaram que o período de 72 horas de exposição dos nematoides aos tratamentos não promoveu resultados significativos, em termos de maior eficiência de controle, quando comparados aos observados para o

período de 48 horas. No período de 48 horas, as concentrações de 17,5% e 20,0% de resíduo fresco ou fermentado causaram mortalidade semelhante à observada para o nematicida comercial, com valores entre 98,0% e 100,0%, sem diferença significativa entre si (Figura 1 B).

Ao comparar, por meio de contrastes ortogonais, o efeito do tratamento com resíduo de sisal (fresco ou fermentado) e com o nematicida na imobilidade de *M. javanica* verificou-se que o resíduo de sisal foi mais eficiente quando aplicado nas concentrações igual ou superior a 7,5%. Com relação à mortalidade dos juvenis após 48 horas, para as maiores concentrações (16,0% e 20,0%) do resíduo, independente de ser fresco ou fermentado, não houve diferença significativa entre o efeito do resíduo e do nematicida, comprovando a sua ação nematicida (Tabela 1). O processo de fermentação não alterou a atividade nematicida deste resíduo líquido.

A eficácia anti-helmíntica *in vitro* do resíduo líquido de sisal foi demonstrada sobre ovos e larvas de nematoides gastrointestinais de ovinos e caprinos (Domingues *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2012; Botura *et al.*, 2013).

Controle de *M. javanica* em mudas de tomateiro com resíduo líquido de sisal

Para as variáveis de crescimento das plantas, não houve efeito significativo das concentrações de ambos os resíduos, nem houve interação entre as concentrações e o tipo de resíduo. Verificou-se apenas diferença significativa do efeito simples do tipo do resíduo sobre estas variáveis. As plantas tratadas com o resíduo fresco apresentaram maior altura e maior acúmulo de massa seca da parte aérea, quando comparadas as tratadas com o resíduo fermentado (Tabela 2). Não houve efeito dos tratamentos no diâmetro caulinar e na massa seca das raízes.

Comparando-se o efeito do resíduo de sisal e do nematicida no crescimento das plantas, observa-se que o nematicida promoveu redução de todos os parâmetros de crescimento (altura das plantas, diâmetro caulinar, massa seca de parte aérea e massa seca de raízes) quando comparado ao resíduo de sisal, em todas as concentrações (Tabela 1). As plantas submetidas

ao tratamento com nematicida apresentaram sintomas de fitotoxicidade, a exemplo de folhas murchas e secas e redução do crescimento, mesmo tendo sido aplicada uma dose quatro vezes inferior à utilizada por Nasu *et al.* (2010). Provavelmente, a forma de aplicação do nematicida promoveu a fitotoxicidade nas plantas, uma vez que o nematicida foi aplicado no solo com as plantas de tomateiro já transplantadas. Nasu *et al.* (2010) utilizaram doses de manipueira e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) como testemunha em tomateiro. Entretanto, estes autores aplicaram os tratamentos no substrato infestado com *M. incognita* e somente quatro dias após, foi feito o transplântio das mudas. Santos *et al.* (2013) aplicaram compostos orgânicos e o nematicida Carbofuran (Furadan 350 SC) no substrato contendo *M. javanica* e, também após 4 dias, ocorreu o transplântio das mudas de bananeira. Estes autores não observaram efeito fitotóxico do nematicida aplicado antes do plantio das mudas de tomateiro e bananeira.

Lopes *et al.* (2005) utilizaram extratos de mucuna preta e de manjeriço, via foliar, no controle de *M. javanica* e de *M. incognita* em tomateiro e verificaram que os extratos não afetaram a altura e nem a massa fresca da parte aérea das plantas em relação ao controle. Sugere-se que as concentrações baixas e a quantidade aplicada do resíduo do sisal podem não ter fornecido nutrientes nas quantidades necessárias para promover o melhor crescimento das plantas.

Apesar deste trabalho ter sido repetido para confirmação dos resultados, optou-se por utilizar somente os resultados do primeiro ensaio, visto que, os resultados foram semelhantes em ambos os ensaios, para os resíduos testados e as variáveis analisadas, sem alterações na condução dos ensaios.

A aplicação do resíduo fresco ou fermentado no substrato causou redução nos números de galhas e de massas de ovos por planta e por grama de raízes, para todas as concentrações avaliadas. O maior número de galhas por planta foi encontrado no tratamento testemunha sem resíduo (0,0%). As aplicações das concentrações crescentes do resíduo causaram a redução no número de galhas por planta, com valores máximos de 61,9% e 64,8%, para o

fresco ou fermentado, respectivamente, em relação ao tratamento sem resíduo (0,0%) (Figura 1 C).

A redução no número de galhas por grama de raízes apresentou uma tendência quadrática, chegando até a 63,0%, para a concentração de 20,0% de resíduo fresco. Para o resíduo fermentado, a redução variou entre 35,6% e 67,0% para as concentrações de 4,0% a 20,0% (Figura 1 D). Com o nematicida, foi observada a redução de 99,0% no número de galhas por planta. Entretanto, este número está associado ao reduzido crescimento da planta devido ao efeito fitotóxico do produto.

O número de massas de ovos por planta reduziu nos tratamentos com ambos os resíduos, para todas as concentrações, quando comparados com a testemunha sem resíduo (0,0%). Foram obtidos decréscimos de 95,0% e 92,0% no número de massas de ovos por planta, com a aplicação das concentrações estimadas de aproximadamente de 14,2% (resíduo fresco) e 13,1% (resíduo fermentado), comparados ao tratamento sem a aplicação de resíduo (0%) (Figura 2 A).

Considerando o número de massas de ovos por grama de raízes, foram obtidas também reduções significativas, com decréscimos de 95,0% e 97,0% com a aplicação das concentrações estimadas de aproximadamente de 13,1% (resíduo fresco) e 14,4% (resíduo fermentado), comparado ao tratamento sem resíduo (0%) (Figura 2 B).

Ocorreu redução significativa no número de galhas e, principalmente, no número de massas de ovos por grama de raízes, com apenas uma aplicação do resíduo líquido de sisal, fresco ou fermentado. No ensaio com o resíduo fresco, em todas as concentrações avaliadas, o número de massas de ovos por grama de raízes foi inferior àquele observado no tratamento com o nematicida. Destaca-se que os ovos são fonte de inóculo e disseminação e a redução significativa no número de massa de ovos representa uma quebra no ciclo de vida do nematoide e o consequente controle de sua população no solo.

O modelo quadrático obtido no ajuste para o efeito das concentrações do resíduo de sisal sobre a população final de nematoides e o fator de reprodução (FR), indica a tendência de redução da reprodução deste patógeno com o

aumento da concentração de ambos os resíduos (Figuras 2 C e D). A menor população final de nematoides no solo tratado com resíduo fresco foi obtida para a concentração de 20,0%, com a redução de 51,0% da população e um FR= 1,62, diferindo estatisticamente da testemunha (0%). Entretanto, para o resíduo fermentado, uma menor população final no solo e menor fator de reprodução foram encontrados para todas as concentrações avaliadas, diferindo estatisticamente da testemunha (0%), com redução da população final variando entre 54,7% e 71,7% nas concentrações de 4,0% (FR= 1,43) até 20,0% (FR= 0,89), em relação à testemunha sem resíduo (FR= 3,15) (Figuras 2 C e D).

A redução no número de massas de ovos por grama de raízes e na população final do nematoide, observada nos testes *in vivo*, e o significativo e rápido efeito do resíduo de sisal na imobilidade e mortalidade dos juvenis de *M. javanica* indicam que este resíduo líquido, quando aplicado ao solo, pode contribuir de forma significativa para a redução do dano causado às plantas por *M. javanica*. Obviamente, com a diminuição na fonte de inóculo no solo e na planta, a redução dos danos causados por este nematoide poderá ser observada.

A avaliação das plantas submetidas aos tratamentos com nematicida e com os resíduos indica que o nematicida foi mais eficiente que o resíduo, em todas as concentrações, na redução do número de galhas por planta e por grama de raízes, na redução da população final de *M. javanica* e no fator de reprodução. A massa de ovos por planta não diferiu estatisticamente nos tratamentos com nematicida e com resíduo nas concentrações de 16,0% e 20,0%. Não houve diferença estatística entre estes, para a massa de ovos por grama de raízes, quando se aplicou o resíduo, para todas as concentrações avaliadas (Tabela 1).

Os resultados alcançados nos ensaios conduzidos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o resíduo líquido do sisal, fresco ou fermentado, possui efeito nematicida. Existem relatos na literatura sobre o efeito de extratos de várias espécies de *Agave* no controle de diversos patógenos (Guleria & Kumar, 2009; Barreto *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2012; Botura *et al.*,

2013). Entretanto, ainda são incipientes os trabalhos com o resíduo líquido de *A. sisalana* no controle de nematoides em plantas. Estudos futuros deverão avaliar, durante o ciclo da cultura, as concentrações e os intervalos de tempo entre as aplicações do resíduo líquido e o efeito residual deste nos cultivos subsequentes, bem como, a eficácia da aplicação do resíduo de sisal no controle de *Meloidogyne* spp. em condições de campo e na produção de tomate.

O efeito nematicida observado no presente estudo pode estar associado à ação de metabólitos secundários, como as saponinas, os taninos ou flavonoides presentes no resíduo do sisal, e que tem sido relacionados às atividades biológicas (Barreto *et al.*, 2010; Botura *et al.*, 2011, 2013). Homoisoflavonoides e saponinas isoladas do resíduo de sisal apresentaram atividade anti-helmíntica em caprinos (Botura *et al.*, 2013). As saponinas presentes na fração aquosa de *A. sisalana* interagem com as proteínas da cutícula do nematoide, promovendo o efeito nematicida (Argentiere *et al.*, 2008).

Olabiyi (2004) demonstrou que substâncias presentes nas raízes de mentrasto-do-grande (*Hyptis suaveolens*) e de alfavacão (*Ocimum gratissimum*) e nas folhas de cravo-de-defunto africano (*Tagetes erecta*) possuem saponinas e flavonoides que reduzem a população de *M. incognita* em tomateiro. Maistrello *et al.* (2010) verificaram, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, que taninos condensados controlam *M. javanica*.

Estes metabólitos presente nos resíduos podem ter agido na mortalidade e na inibição da eclosão ou as diferentes fases envolvidas no processo de eclosão como a multiplicação celular, o desenvolvimento embrionário, a troca de cutícula e a saída do ovo podem ser diferentemente afetadas pelos metabólitos e suas concentrações nos resíduos (Campos *et al.*, 2001). Ou ainda, pode ter ocorrido a desorientação dos J2 do nematoide-das-galhas, dificultando a localização das raízes. Desta forma, provavelmente, houve redução ou atraso na penetração de J2 com conseqüente redução do número de galhas e de massas de ovos, conforme observado em estudo anterior (Hewlett *et al.*, 1997).

Seletividade de resíduo líquido de sisal a micro-organismos benéficos

O resíduo líquido fresco de sisal não inibiu o crescimento dos micro-organismos benéficos do solo. Porém, no meio de cultura com resíduo fermentado, apenas o fungo *Penicillium citrinum* cresceu, em todas as concentrações do resíduo (Tabela 3).

Os micro-organismos são essenciais para os sistemas agrícolas, por causa da ação destes nos ciclos biogeoquímicos e na ciclagem da matéria orgânica. Além disso, a comunidade microbiana pode promover o melhor enraizamento de plantas, produzir substâncias promotoras do crescimento e promover a melhor absorção de nutrientes pelas plantas (Reis *et al.*, 2010). Esses micro-organismos também podem atuar no controle biológico de nematoides (Molina & Davide 1986; Damasceno, 2011; Freitas *et al.*, 2012). Observou-se que houve o desenvolvimento de micro-organismos do solo, independente da concentração do resíduo líquido fresco.

Os resultados do presente estudo demonstram o potencial do resíduo líquido de sisal fresco ou fermentado, em todas as concentrações, no controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro. Para o resíduo fresco não foi observado efeito negativo no crescimento de micro-organismos do solo, selecionados como benéficos ao crescimento de plantas ou com potencial de biocontrole de diferentes doenças de plantas. O resíduo fermentado inibiu o crescimento *in vitro* desses micro-organismos, indicando que este pode ter um impacto negativo na microbiota do solo. Entretanto, o resíduo fermentado apresenta facilidades de manuseio, por não requerer refrigeração ou outras formas de conservação. Estudos futuros deverão ser conduzidos visando comprovar a ação nematicida destes resíduos no controle de *M. javanica* em tomateiro no campo, as formas de sua aplicação e o impacto na microbiota do solo.

REFERÊNCIAS

- ARGENTIERI MP; D'ADDABBO T; TAVA A; AGOSTINELLI A; JURZYSTA M; AVATO P. 2008. Evaluation of nematocidal properties of saponins from *Medicago* spp. *European Journal of Plant Pathology* 120: 189-197.
- BARRÊTO AF; ARAÚJO E; BONIFÁCIO BF. 2010. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r *latifolium* Hutch). *Revista Brasileira de Agroecologia* 5: 207-215.
- BONETTI JIS; FERRAZ S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6: 533.
- BOTURA MB; SILVA GD; LIMA HG; OLIVEIRA JVA; SOUZA TS; SANTOS JDG; BRANCO A; MOREIRA ELT; ALMEIDA MAO; BATATINHA MJM. 2011. In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 177: 104-110.
- BOTURA MB; SANTOS JDG; SILVA GD; LIMA HG; OLIVEIRA JVA; ALMEIDA MAO; BATATINHA MJM; BRANCO A. 2013. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology* 192: 211-217.
- CAMPOS VP; CAMPOS JR; SILVA LHCP; DUTRA MR. 2001. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA LHCP; CAMPOS JR; NOJOSA GBA. (eds.) *Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA. p. 125-158.

- CANTU RR; WILCKEN SRS; ROSA JMO; GOTO R. 2009. Reaction of commercial rootstocks to *Meloidogyne mayaguensis* from tomato. *Summa Phytopathologica* 35: 216-218.
- CHITWOOD DJ. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40: 221-249.
- CONAB. 2013, 27 de maio. *Sisal – safra 2012/2013: comercialização – proposta de ações*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_29_11_45_31_sisal2012.pdf>.
- DAMASCENO JCA. 2011. *Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de Meloidogyne javanica em mudas de tomateiro*. Cruz das Almas: UFRB. 97p. (Dissertação mestrado).
- DAMASCENO CL; SOARES ACF; SA JO; SILVA RM; CARMO CO; SACRAMENTO ACSC. 2012. Antagonismo de *Penicillium citrinum* à *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal. In: XXXV CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 38, *Resumos...* Jaguariúna: SOB (CD-ROM).
- DOMINGUES, LF; BOTURA MB; CRUZ ACFG; YUKI CC; SILVA GD; COSTA MS; MURPHY G; MOREIRA ELT; MENESES IDS; ALMEIDA MGAR; BRANCO A; ALMEIDA MAO; BATATINHA MJM. 2010. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Revista Brasileira de Parasitologia* 19: 270-272.
- FREITAS MA; PEDROSA EMR; MARIANO RLR. MARANHÃO SRVL. 2012. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. *Nematropica* 42:115-122.

- GULERIA S; KUMAR A. 2009. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42: 370 -375.
- HEWLETT TE; HEWLET EM; DICKSON DW. 1997. Response of *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines* and *Radopholus similis* to tannic acid. *Journal of Nematology* 29: 737-741.
- KERBOEUF D; RIOU M; GUÉGNARD F. 2008. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8: 116-128.
- LOPES EA; FERRAZ S; FREITAS LG; FERREIRA PA; AMORA DX. 2005. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. *Nematologia Brasileira* 29: 67-74.
- MAISTRELLO L; VACCARI G; SASANELLI N. 2010. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Helminthologica* 47: 48-57.
- MOLINA GC; DAVIDE RG. 1986. Evaluation of microbial extracts for nematicidal activity against plant parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis*. *Philippine Agriculturist* 69: 173-186.
- MORAIS LAS; MATTOS LPV; GONÇALVES GG; BETTIOL W. 2009. Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. *Horticultura Brasileira* 27: 113-117.
- NASU EGC; PIRES E; FORMENTINI HM; FURLANETTO C. 2010. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios *in vitro* e em tomateiros em casa de vegetação. *Tropical Plant Pathology* 35: 032-036.

NEVES WS; FREITAS L G; LOPES EA; COUTINHO MM; DALLEMOLE-GIARETTA R; FERRAZ S. 2008. Efeito, *in vitro*, do extrato de sementes de mamão sobre a eclosão e juvenis de *Meloidogyne* spp. *Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas* 2: 9-14.

OLABIYI TI. 2004. *Assessment of the nematocidal properties of extracts from Tagetes erecta, Ocimum gratissimu, Hyptis suaveolous and Crotalaria retusa*. Ilorin, Nigeria: University of Ilorin. 177p. (Thesis).

OOSTENBRINK M. 1966. Major characteristic of relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool* 66: 1-46.

REIS VM; ANDRADE G; FARIA SM; SILVEIRA AOD. 2010. Interações de fungos micorrízicos arbusculares com outros mecanismos do solo. In SIQUEIRA JO; SOUZA FA; CARDOSO EJBN; TSAI SM. (Org). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA.

SA JO. 2013. *Controle biológico da podridão vermelha do sisal (Agave sisalana Perrine) com Trichoderma spp. e actinobactérias*. Cruz das Almas: UFRB 133p. (Tese doutorado).

SANTOS BHC; RIBEIRO RCF; XAVIER AA; NETO JAS; MOTA VJG. 2013. Controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de bananeira Prata-Anã por compostos orgânicos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35: 650-656.

SCHENKEL EP; GOSMANN G; ATHAYDE ML. 2010. Saponinas. In: SIMÕES CMO; SCHENKEL EP; GOSMANN G; MELLO JCP; MENTZ LA; PETROVICK PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p. 711-734.

SILVA, O.R.R.F.; BELTRÃO, N.E.M. (Eds.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa SPI; Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1999. p. 205.

SILVEIRA RX; CHAGAS ACS; BOTURA MB; BATATINHA MJM; KATIKI LM; CARVALHO CO; BEVILAQUA CML; BRANCO A; MACHADO EAA; BORGES SL; ALMEIDA MAO. 2012. Action of sisal (*Agave sisalana* Perrine) extract in the *in vitro* development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology* 131: 162–168.

SUINAGA FA; SILVA, ORRF; COUTINHO WM. 2006. *Cultivo de sisal na região Semi-árida do nordeste brasileiro*. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. 42p.

Tabela 1: Estimativas dos contrastes (nematicida x concentrações do resíduo líquido de sisal fresco ou fermentado) e significância para os parâmetros avaliados no controle de *Meloidogyne javanica in vitro* (após 24 e 48 horas) e *in vivo* (altura das plantas - AP, diâmetro caulinar - DC, massa seca da parte aérea - MSPA, massa seca da raiz - MSR, número de galhas - NG, massas de ovos -MO, população final de nematóides - PF e fator de reprodução - FR. Estimates of contrasts (nematicide x concentrations of fresh or fermented sisal liquid residue) and significance for all parameters evaluated for control of *Meloidogyne javanica in vitro* (after 24 and 48 hours) and *in vivo* (plant height - AP, stem diameter - DC, shoot dry matter -MSPA, root dry matter - MSR, number of galls - NG, egg masses -MO, final population – PF, and reproduction factor - FR. Cruz das Almas, UFRB, 2012.

CONTRASTES	MORTALIDADE				
	24 HORAS		48 HORAS		
2,5% X Nematicida		-2,04 ^{ns}			-6,28 ^{**}
5,0% X Nematicida		-2,22 ^{ns}			-5,69 ^{**}
7,5% X Nematicida		18,64 ^{**}			-4,44 ^{**}
10,0% X Nematicida		24,72 ^{**}			-5,72 ^{**}
12,5% X Nematicida		52,99 ^{**}			-2,49 ^{**}
15,0% X Nematicida		65,51 ^{**}			-2,05 ^{**}
17,5% X Nematicida		74,64 ^{**}			0,40 ^{ns}
20,0% X Nematicida		77,91 ^{**}			0,41 ^{ns}
CONTRASTES	AP	DC	MSPA	MSR	PF
4,0% X Nematicida	46,50 ^{**}	0,09 ^{**}	5,41 ^{**}	1,08 ^{**}	7763,64 ^{**}
8,0% X Nematicida	45,99 ^{**}	0,12 ^{**}	5,55 ^{**}	1,09 ^{**}	7477,92 ^{**}
12,0% X Nematicida	45,71 ^{**}	0,10 ^{**}	4,90 ^{**}	1,02 ^{**}	5570,78 ^{**}
16,0% X Nematicida	44,50 ^{**}	0,14 ^{**}	5,36 ^{**}	1,09 ^{**}	4792,21 ^{**}
20,0% X Nematicida	46,06 ^{**}	0,09 ^{**}	5,19 ^{**}	0,84 ^{**}	3685,07 ^{**}
CONTRASTES	NG/planta	NG/g raiz	MO/planta	MO/g raiz	FR
4,0% X Nematicida	170,82 ^{**}	10,77 ^{**}	44,47 ^{**}	2,26 ^{ns}	1,94 ^{**}
8,0% X Nematicida	185,39 ^{**}	9,42 ^{**}	40,90 ^{**}	1,68 ^{ns}	1,87 ^{**}
12,0% X Nematicida	165,82 ^{**}	6,83 ^{**}	36,47 ^{**}	0,66 ^{ns}	1,39 ^{**}
16,0% X Nematicida	156,82 ^{**}	6,57 ^{**}	22,69 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	1,20 ^{**}
20,0% X Nematicida	125,75 ^{**}	5,15 ^{**}	29,33 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,92 ^{**}

** - Significativo a 1% ($p \leq 0,01$) * - significativo a 5% ($p \leq 0,05$) ns - não significativo a 5% ($p > 0,05$). [Significant at 1% ($p \leq 0.01$) * - significant at 5% ($p \leq 0.05$) ns - not significant at 5%].

Tabela 2. Altura das plantas - AP, diâmetro caulinar -DC, massa seca da parte aérea - MSPA, massa seca das raízes – MSR, de plantas de tomateiro infectadas por *Meloidogyne javanica* e tratadas com resíduo líquido de sisal, fresco ou fermentado. (Plant height - AP, stem diameter - DC, shoot dry matter - MSPA, root dry matter - MSR of tomato plants infected with *Meloidogyne javanica* and treated with fresh and fermented sisal liquid residue). Cruz das Almas, UFRB, 2012.

Resíduo de sisal	AP (cm)	DC(cm)	MSPA(g)	MSR (g)
Fresco	79,55 a	0,73 a	7,36 a	1,20 a
Fermentado	74,48 b	0,73 a	5,89 b	1,18 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F. [Means with the same letters do not differ statistically (F test).

Tabela 3. Seletividade do resíduo líquido de sisal, fresco ou fermentado, a micro-organismos benéficos do solo (Selectivity of fresh or fermented sisal liquid residue on beneficial soil microorganisms). Cruz das Almas, UFRB, 2012.

Micro-organismos	Resíduo líquido de sisal	
	Fresco	Fermentado
<i>Penicillium citrinum</i>	+	+
<i>Trichoderma atroviride</i>	+	-
<i>T. harzianum</i>	+	-
<i>T. virens</i>	+	-
BFT4	+	-
BFT7	+	-
BFT11	+	-
BFT41	+	-
BFT71	+	-
BFT87	+	-
BFT88	+	-
BFT102	+	-
BFT106	+	-
PD3	+	-

Os sinais indicam presença (+) ou ausência (-) de crescimento de micro-organismos em meios de cultura com o resíduo líquido de sisal [Signs indicate presence (+) or absence (-) of growth of microorganisms in culture media amended with sisal liquid residue].

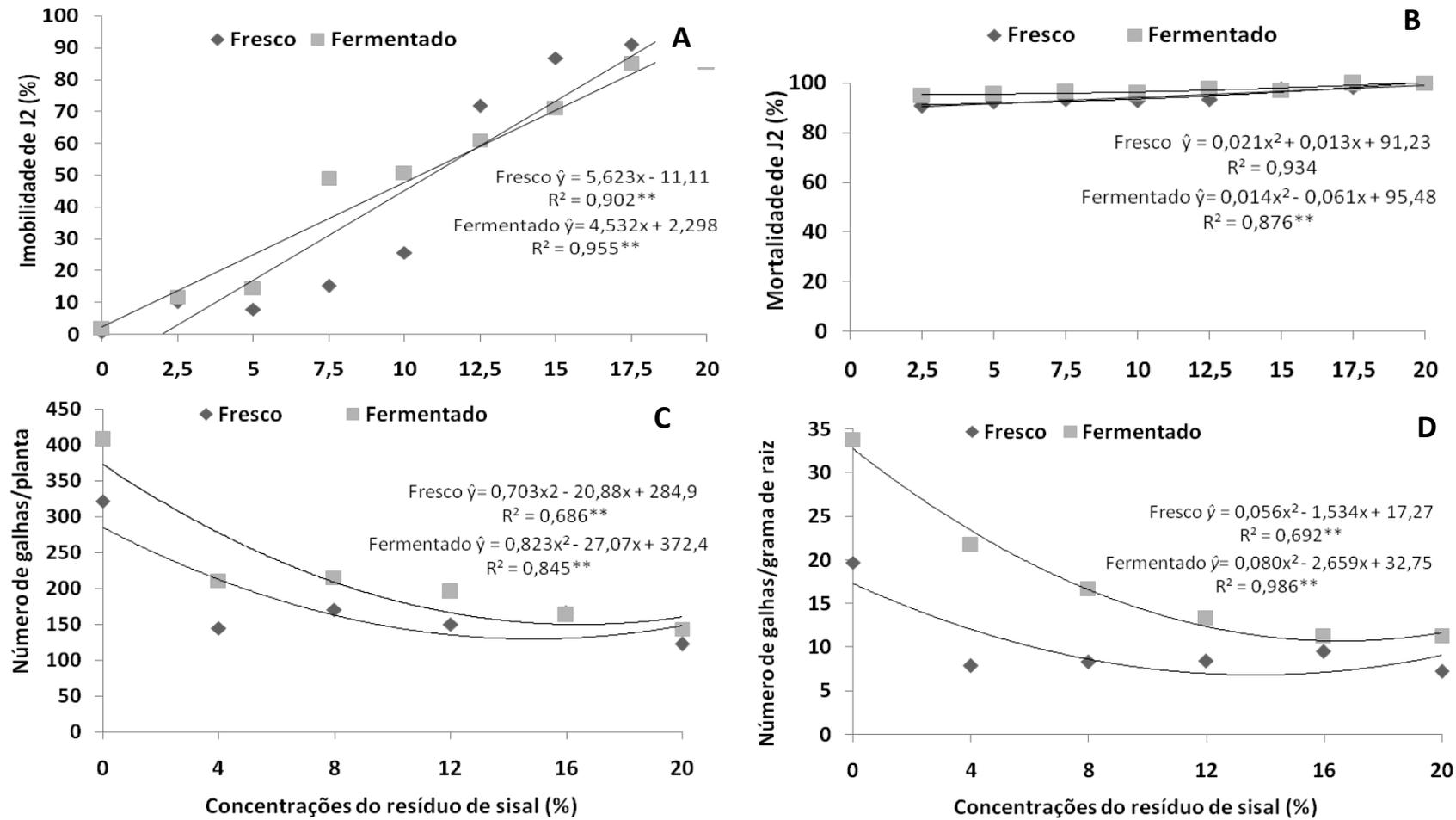


Figura 1. Controle de *Meloidogyne javanica* com resíduo líquido de sisal, fresco ou fermentado, após exposição em condições *in vitro* por 24 horas **(A)** e 48 horas **(B)** e em condições de casa de vegetação, em plantas de tomateiro infectadas por *M. javanica* e tratadas com resíduo de sisal: número de galhas por planta **(C)** e por grama de raiz **(D)**. [Control of *Meloidogyne javanica* with fresh or fermented sisal liquid residue, after exposure under *in vitro* conditions for 24 hrs (A) and 48 hrs (B), and under greenhouse conditions in tomato plants infected with *M. javanica* and treated with fresh and fermented sisal liquid residue: number of galls per plant (C) and per gram of roots (D)]. Cruz das Almas, UFRB, 2012.

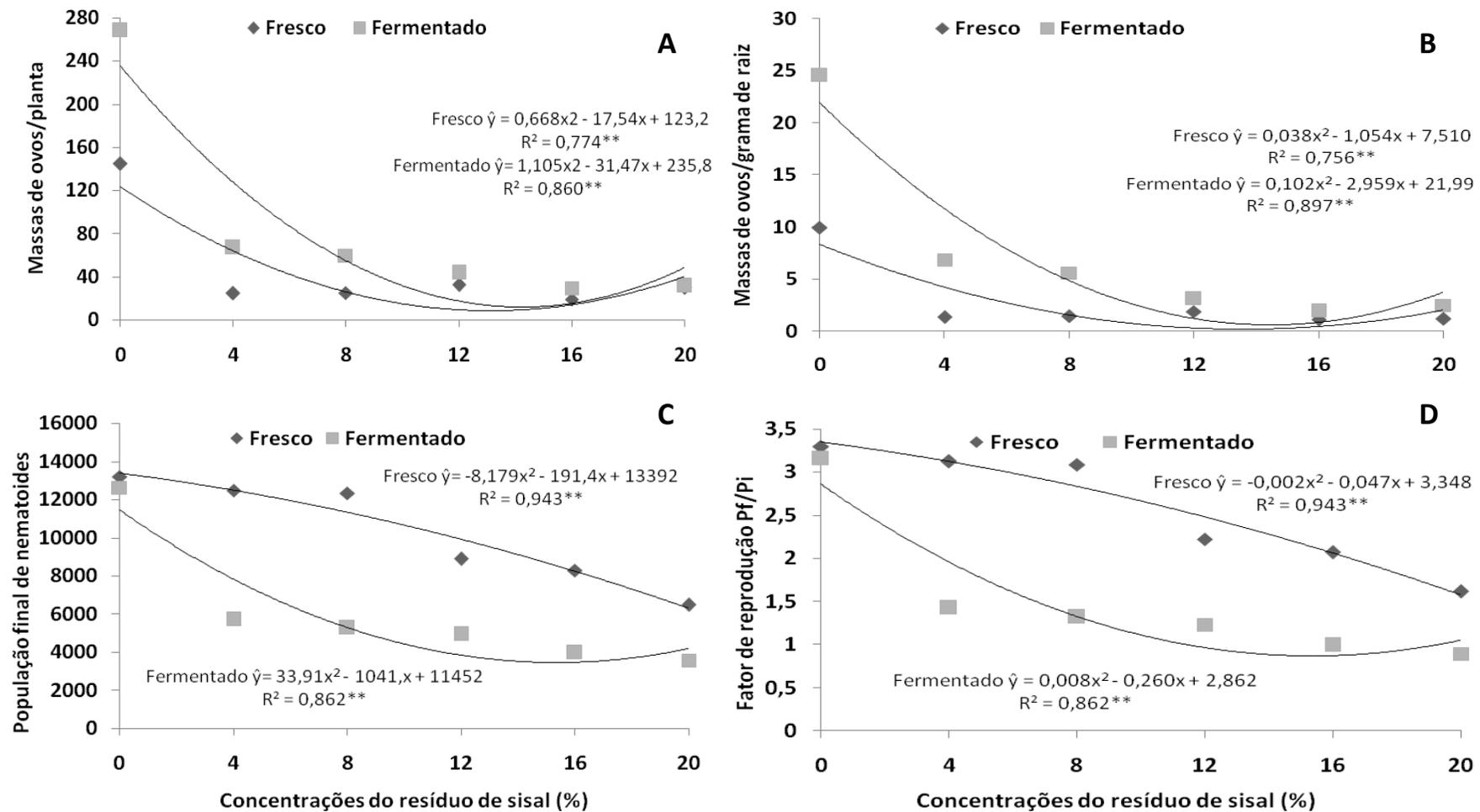


Figura 2. Massas de ovos por planta (A); massas de ovos por grama de raiz (B); população final de nematoides (C) e fator de reprodução (D) de *Meloidogyne javanica* em solo com plantas de tomateiro tratadas com resíduo líquido de sisal, fresco ou fermentado. [egg masses per plant (A); egg masses per gram of roots (B); final population (C) and reproduction factor (D) of *Meloidogyne javanica* in soil with tomato plants treated with fresh or fermented sisal liquid residue]. Cruz das Almas, UFRB, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agrotóxicos utilizados nos sistemas de produção agrícola para o controle de patógenos causam diversos problemas ambientais. O controle biológico e o controle orgânico de doenças de plantas surgem como alternativas aos agrotóxicos, a exemplo dos nematicidas comerciais que são tóxicos ao ambiente, causam a contaminação de animais, dos agricultores, de reservatórios naturais e artificiais de água, deixam resíduos no solo e nos alimentos, promovem o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos fitopatógenos e ainda tem custo elevado.

Os *Streptomyces* spp. avaliados neste trabalho demonstraram a capacidade de controlar o nematóide-das-galhas no tomateiro, contribuindo assim, para a redução dos danos na planta e a promoção do crescimento do tomateiro. Este efeito de biocontrole foi obtido nas plantas cultivadas em solo com ou sem esterco bovino (Capítulo 1). Trabalhos em campo deverão ser realizados para aprimorar o conhecimento gerado sobre o potencial destes isolados de *Streptomyces* spp. para um controle eficiente de *M. javanica*, com melhor crescimento e produção do tomateiro e de outras holerícolas de importância econômica. Isto irá contribuir para a estabilidade da produção e, conseqüentemente, para a produção mais sustentável de culturas hortícolas, com maior retorno dos investimentos feitos pelos produtores e menor impacto ao meio ambiente e a saúde humana e animal.

O extrato aquoso e o pó moído provenientes do resíduo sólido seco de sisal (Capítulo 2) e os resíduos líquidos fresco e fermentado (Capítulo 3), em razão dos valores elevados observados na mortalidade de J2 de *M. javanica*, bem como na redução dos danos em raízes de tomateiro, sob condições de casa-de-vegetação, apresentaram-se como promissores, com potencial para sua utilização no manejo integrado do nematóide-das-galhas.

O resíduo líquido ou sólido do desfibramento de folhas de sisal promove o controle do nematóide-das-galhas e, portanto, apresenta elevado potencial para utilização em sistemas de produção agrícola ambientalmente mais sustentáveis, mediante a geração de um produto bioativo, a partir de um subproduto que é descartado em grandes quantidades nas propriedades rurais, sem o tratamento adequado.

Novos trabalhos serão desenvolvidos visando identificar os compostos presentes nestes resíduos e o estudo de como estes agem no controle de nematóides. O uso destes resíduos como nematicida reduzirá as perdas devido à infecção das plantas por nematoides fitoparasitas, pois todo o setor agrícola sofre enormes perdas provocadas por estes patógenos.

Por ser um produto de baixo custo, poderá ser utilizado pela agricultura familiar, pelos pequenos, médios e grandes produtores durante o todo o ano. Além disso, promoverá significativo impacto econômico e social para os produtores de sisal que poderão comercializar os resíduos líquido e o sólido do desfibramento das folhas de sisal, com aumento da renda do cultivo do sisal, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida desses produtores do semiárido da Bahia. Também poderá promover redução no impacto ambiental gerado pelo descarte inadequado deste resíduo após o desfibramento das folhas de sisal. Também apresenta grande impacto econômico por ser um produto para o controle de fitonematoides em culturas de importância econômica, contribuindo para evitar a disseminação e infecção de culturas por fitonematoides.

ANEXO

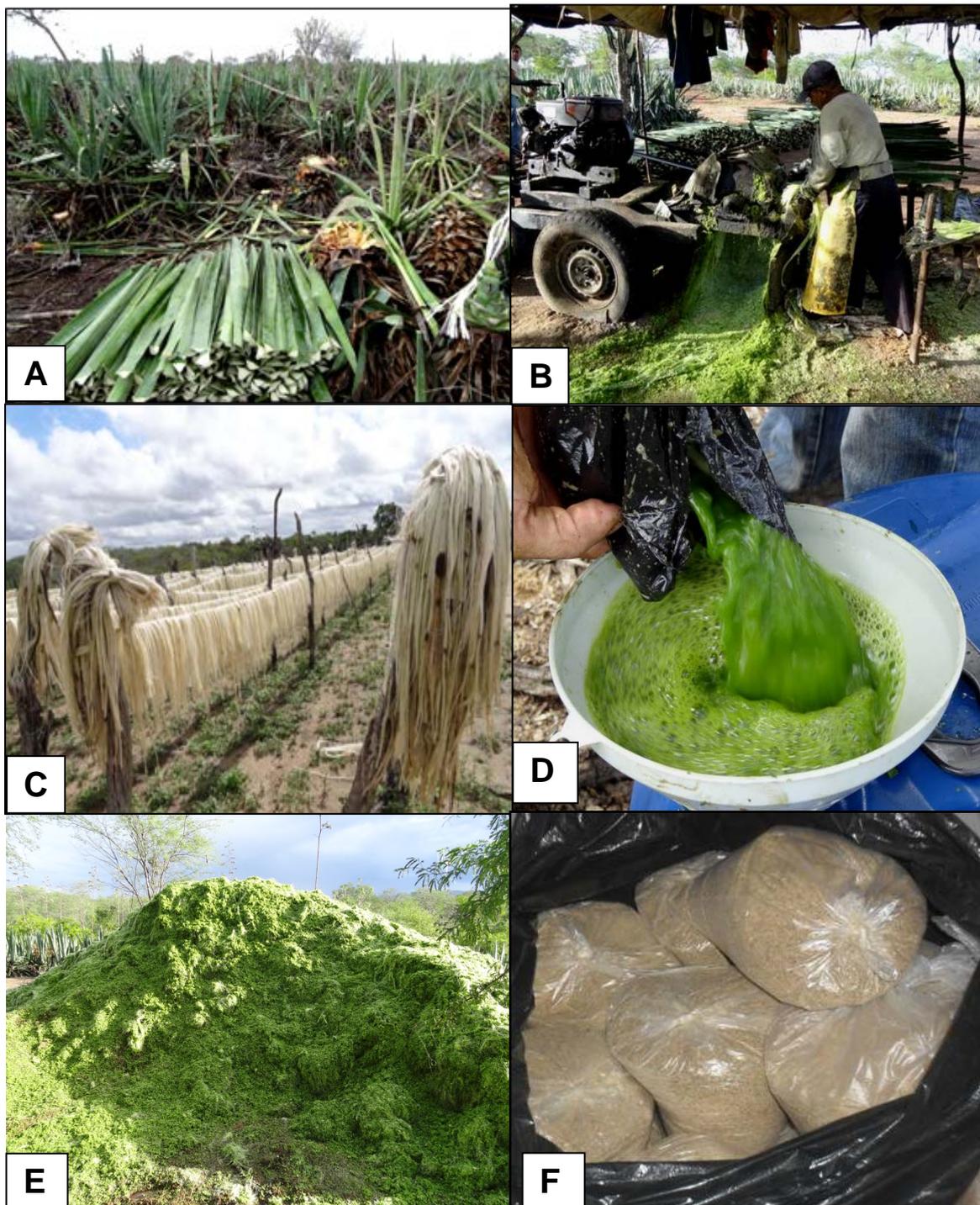


Figura 1. A) Corte das folhas de sisal no campo; B) Processo de desfibramento das folhas, C) Secagem das fibras em estaleiro; D) Coleta do resíduo líquido após o desfibramento das folhas; E) Descarte do resíduo sólido de sisal no campo e F) Resíduo sólido seco após o processo de moagem. Valente, Bahia. Fonte: Soares, 2014.