

JEANE ÉMILI DE MEDEIROS

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA CONTROLE DA
MELOIDOGINOSE E ATIVIDADE ISOENZIMÁTICA DE
MELOEIRO PARASITADO POR *Meloidogyne incognita***

**RECIFE - PE
FEVEREIRO, 2007**

JEANE ÉMILI DE MEDEIROS

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA CONTROLE DA
MELOIDOGINOSE E ATIVIDADE ISOENZIMÁTICA DE
MELOEIRO PARASITADO POR *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof.^a Dr.^a Elineide Barbosa da Silveira - Orientadora

Prof.^a Dr.^a Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-Orientadora

Prof.^a Dr.^a Elvira Maria Regis Pedrosa - Co-Orientadora

**RECIFE - PE
FEVEREIRO, 2007**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M488s Medeiros, Jeane Émile de
Seleção de bactérias para controle da meloidoginose e
atividade isoenzimática de meloeiro parasitado por
Meloidogyne incognita / Jenae Émile de Medeiros. - 2007.
76 f.: il.

Orientadora: Elineide Barbosa da Silveira
Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Agronomia.
Inclui bibliografia.

CDD 632. 9

1. *Cucumis melo*
 2. Rizobactérias
 3. Bactérias endofíticas
 4. Manejo
- I. Silveira, Elineide Barbosa da
 - II. Título

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA CONTROLE DA
MELOIDOGINOSE E ATIVIDADE ISOENZIMÁTICA DE
MELOEIRO PARASITADO POR *Meloidogyne incognita***

JEANE ÉMILI DE MEDEIROS

Dissertação defendida e _____ pela Banca Examinadora em 26 de fevereiro de 2007.

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a. Elineide Barbosa da Silveira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a. Luiza Suely Semen Martins (UFRPE)

Prof.^a Dr.^a. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcanti (UFPE)

**RECIFE
FEVEREIRO, 2007**

A Deus

Pela dádiva da vida, pelo amor e pela força para superar todas as etapas do meu caminho.

Aos meus pais

Jurandir Rodrigues de Medeiros e Maria Edna de Vasconcelos Medeiros, pelo exemplo de vida, amor, dedicação e compreensão que me ensinaram a viver.

As minhas irmãs

Juciane Elba de Medeiros e Jamile Érica de Medeiros, pelo companheirismo, solidariedade e incentivo na busca de novos horizontes.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

As orientadoras

Elineide Barbosa da Silveira, Rosa de Lima Ramos Mariano e Elvira Maria Régis Pedrosa pela instrução e experiências acadêmicas e de vida transmitidas com paciência e esmero.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação

Pelo ensino e dedicação para minha formação de Mestre em Fitossanidade.

Aos funcionários

Darcy Martins, Luiz Coelho, Mauricio Estolano e a Ivanise Ribeiro Viana

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade

Pelo auxílio nos procedimentos relativos à pesquisa, aos assuntos burocráticos e institucionais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)

Pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos

Daniela Silva Salgues de Matos, Carmem Virginia Mendonça Aguiar da Silva, Roberto Brito Cavalcanti, Thiciano Miranda Leão, Sandra Roberta Vaz Lira Maranhão, Lílian Margarete Paes Guimarães pelo auxílio nos momentos difíceis, Jakeline Galdino e Maria José de Santana.

Aos estagiários dos Laboratórios de Fitobacteriologia e Fitonematologia

Mirzânia, Leandro, Enildo, Alessandro, Marco, Juliana, Kédima, Virginia, Roberto e Thiciano pelo trabalho e dedicação dispostos sempre a ajudar nas várias etapas da pesquisa.

Aos colegas do curso de Mestrado

Michelle, Waléria, Otacílio e Jearbes e de Doutorado Zilderlânia pela harmoniosa convivência, incentivo e colaboração durante o período de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁG.
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO II – Isolamento e seleção de bactérias para controle da meloidoginose em meloeiro	
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados e Discussão.....	48
Referências Bibliográficas.....	53
CAPÍTULO III – Atividade isoenzimática de plantas de meloeiro parasitadas por <i>Meloidogyne incognita</i> Raça 2	
Resumo.....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão.....	66
Referências Bibliográficas.....	69
CONCLUSÕES GERAIS	76

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi isolar e selecionar bactérias para o controle da meloidoginose e avaliar a atividade isoenzimática de plantas de meloeiro parasitadas por *Meloidogyne incognita* raça 2. A partir de solo rizosférico de meloeiro foram obtidos 61 isolados de rizobactérias que juntamente com 56 isolados endofíticos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE foram testados. Plântulas de meloeiro Amarelo com 10 dias tiveram o solo infestado com 1000 ovos de *M. incognita* raça 2. Dois dias antes da infestação do solo foram depositados 20 mL da suspensão bacteriana (0,7 A) por vaso. Decorridos 60 dias, foram determinadas as biomassas frescas da parte aérea e das raízes, os índices de galhas e de massa de ovos e o fator de reprodução do nematóide. Dos 117 isolados testados, foram selecionados inicialmente os endofíticos ENM7, ENM10 e ENM51 que reduziram significativamente o índice de massa de ovos e/ou o índice de galhas. Contudo, quando testados novamente, separadamente ou em misturas, esses isolados não mantiveram a eficiência na redução dessas variáveis e *in vitro* também não afetaram a eclosão dos juvenis. Para o estudo da atividade das isoenzimas α e β -esterase, peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase, plantas de meloeiro com dez dias de idade, tiveram o solo infestado com 500 ovos do nematóide por planta, sendo mantidas em casa de vegetação. Aos 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 32 dias após a infestação do solo a terceira folha das plantas foi coletada e submetida à eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida. Apenas a β -esterase e a malato desidrogenase mostraram polimorfismo entre as bandas expressas pelas amostras das plantas parasitadas por nematóides, quando comparadas às plantas testemunhas. A presença do nematóide inibiu a expressão de alguns genes β -esterase e ativou a expressão de outros da malato desidrogenase.

Palavras-chave: *Cucumis melo*, rizobactérias, bactérias endofíticas, manejo, isoenzima.

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate and select bacteria for the control of *Meloidogyne incognita* and to evaluate the isozymatic activity of melon plants parasitized. Sixty-one rhizobacterium isolates obtained from rhizosphere soil and 56 endophytic obtained from the Culture Collection of Plant Bacteriology Laboratory - Federal Rural University of Pernambuco were tested. Melon seedlings yellow type 10 days old had their soil infested with 1000 eggs of *Meloidogyne incognita* race 2. Two days before soil infestation 20 mL of bacterial suspension (0,7 OD) were deposited in each pot. After 60 days fresh biomass of shoot and root, gall index, egg mass index and nematode reproduction factor were determined. Among 117 isolates the endophytic ENM7, ENM10 and ENM51 were selected because they significantly reduced egg mass index and/or gall index. However when tested again, separately or in mixtures, these isolates did not maintain their efficiency and besides they did not affect egg hatching *in vitro*. In order to study the activity of the isozymes α and β -esterase, peroxidase, acid phosphatase and malate dehydrogenase, plants of melon with 10 days old, had their soil infested with 500 nematode eggs per plant, and maintained in greenhouse. At 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 32 days after soil infestation the third leaf of each plant was collected and processed for electrophoresis of isozymes in polyacrilamide gel. Only β -esterase and malate dehydrogenase showed polymorphism between bands expressed by plants parasitized by nematodes when compared to the control plants. The nematode inhibited the expression of some β -esterase genes and activated the expression of other malate dehydrogenase genes.

Keywords: *Cucumis melo*, rhizobacteria, endophytic bacteria, management, isozyme.

CAPÍTULO I

**INTRODUÇÃO
GERAL**



INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do meloeiro: características e importância econômica

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma planta da família das cucurbitáceas, anual, herbácea, rasteira, de haste sarmentosa que apresenta sistema radicular com crescimento abundante nos primeiros 30 cm de profundidade do solo, podendo alcançar até 1 m de profundidade. Apresenta folhas pilosas, pecioladas, alternadas, simples, palmadas, reniformes ou pentalobuladas, angulosas quando jovens e subcodiformes quando completamente desenvolvidas. Quanto a presença de flores, as plantas podem ser monóicas, ginóicas ou, na sua maioria, andromonóicas (presença de flores masculinas e hermafroditas). O fruto é uma baga indeiscente variando bastante, tanto com relação ao tamanho quanto ao formato (achatado, redondo ou cilíndrico). A casca pode ser lisa, ondulada ou rendilhada e de várias cores (branca, amarela, preta, verde e marrom). A polpa, quanto à textura, pode ser crocante ou dissolvente, de coloração clara ou alaranjada e conforme a cultivar pode ser de sabor doce acentuado. As sementes, numerosas, encontram-se na cavidade interna (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1997; PEDROSA, 1997).

É uma planta exigente em temperaturas elevadas, diurnas e noturnas, no ar e no solo, ao longo do ciclo natural. Todas as fases de desenvolvimento da planta, inclusive a germinação e emergência são prejudicadas por baixas temperaturas. Cada cultivar possui limite térmico mínimo, máximo e ótimo para um bom desenvolvimento (FILGUEIRA, 1981). A germinação das sementes requer um mínimo de 18 °C e um máximo de 45 °C, sendo 31 °C, a temperatura ideal. De maneira geral, o crescimento vegetativo do meloeiro é

prejudicado por temperatura do ar inferior a 13 °C e superior a 40°C, sendo a faixa de 25 a 32°C considerada ótima. Com relação à temperatura do solo, 14°C é tida como condição mínima, e 40°C como máxima para o bom desenvolvimento radicular, sendo 34°C a temperatura ideal para o desenvolvimento das radicelas. Com relação ao florescimento, a faixa ótima de temperatura encontra-se entre 20 e 23°C (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1997).

A umidade também constitui fator determinante para o desenvolvimento vegetativo, sendo a água o principal constituinte vegetal (cerca de 80%). A água atua no transporte, como reagente no metabolismo básico, na turgescência celular e é responsável pela forma e estruturas dos órgãos, atuando, ainda, no mecanismo somático, na penetração do sistema radicular no solo, tornando-se então, essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetativo (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1997). Contudo, segundo Filgueira (1981), o excesso de umidade no ar e no solo prejudica a fisiologia da planta e a produção de melão, os quais apresentam-se pequenos e insípidos, com baixo teor de açúcares devido à desfolha precoce e ao surgimento de doenças fúngicas.

O meloeiro tem preferência por solos profundos, leves, ricos em matéria orgânica, planos e com boa exposição ao sol. É uma planta de crescimento rápido, e em condições ideais chega a crescer cerca de 4,0 cm durante o dia e 3,0 cm, durante a noite (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1997; FILGUEIRA, 1981).

O clima semi-árido do Nordeste brasileiro favorece a planta, a produtividade e também a qualidade dos frutos, contribuindo para elevar o teor de açúcares, tornando o sabor e o aroma mais ricos e melhorando a consistência e durabilidade dos frutos (FILGUEIRA, 2003).

As principais variedades de melão produzidas comercialmente pertencem a dois grupos: *C. melo inodorus* Naud. e *C. melo cantaloupensis* Naud., que correspondem, respectivamente, aos melões inodoros e aos melões aromáticos variedades Cantaloupensis e Reticulatus (GOMES JUNIOR et al., 2001).

O centro de diversidade genética do meloeiro não está claramente estabelecido, sendo localizado por alguns autores na África, enquanto para outros no oeste da Ásia. Relatos dão conta que os primeiros cultivos desta espécie foram realizados pelos Egípcios no ano 2400 A.C. Contudo, apenas a partir do século XVI o melão foi disperso por todo o mundo, originando uma vasta gama de formatos, cores e tipos de frutos (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1997). No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus na década de 1860, e inicialmente cultivado no Rio Grande do Sul, São Paulo, região Nordeste e sul do estado do Pará (CARNEIRO, 2000).

Em 2004 o meloeiro foi cultivado em 72 países, com uma produção total de 27,4 milhões de t, destacando-se a China com 52,38% da produção mundial. Nesse mesmo ano o Brasil deteve 0,57% dessa produção, ocupando a 21ª posição do ranking (FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION- FAO, 2005).

No ano de 2005, a produção brasileira de melão foi estimada em 293,8 mil t, sendo a região Nordeste responsável por 93,24% dessa produção (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2005). Nesse mesmo ano, o Brasil exportou 827,6 mil t de frutas frescas, sendo 179,8 mil t de melão, o que corresponde a 21,73% desse montante, rendendo US\$ 91 milhões (DATAFRUTA, 2005; SECEX/DATAFRUTA-IBRAF, 2005). No Nordeste, o cultivo de meloeiro tem se expandido rapidamente nos últimos anos, registrando um crescimento expressivo em alguns Estados, a exemplo do Ceará, segundo maior produtor nacional, que em 2005 produziu 117,9 mil t de melão em

uma área cultivada de 4.951 ha (IBGE, 2005). O Rio Grande do Norte destaca-se como líder nacional de produção e exportação de melão tendo exportado em 2002 cerca de 98 mil t, gerando uma renda *free on board* (FOB) ao redor de US\$ 37,8 milhões de dólares (SALES JUNIOR et al., 2006). A produção de melão no Rio Grande do Norte se concentra no Agropólo de Mossoró-Açu, que abrange outros municípios como Baraúna, Apodi, e os da região conhecida como Baixo Açu (OLIVEIRA; GURGEL; LIMA, 2005).

As variedades de maior expressão, tanto em relação ao ciclo mais rápido de produção quanto de mercado internacional, são os melões do tipo Cantaloupe e Honey Dew, produzidos principalmente pela Espanha, Estados Unidos e Israel. Aproximadamente 98% do melão produzido no Brasil pertence ao grupo Amarelo (“Yellow Honey Dew”) do qual fazem parte diversas cultivares e híbridos. Entretanto, outras cultivares (variedades *Cantaloupe* e *Reticulatus*) têm sido utilizadas pelos produtores visando atender as preferências de consumidores mais exigentes e até mesmo de alguns importadores (GOMES JUNIOR et al., 2001). No porto de Natal-RN em 2002, o melão tipo Amarelo representou 50,33% das exportações, enquanto os tipos Orange Flesh e Pele de Sapo representaram, respectivamente 19,06 e 9,90%. Os demais tipos Gália, Cantaloupe e Charantais considerados nobres pelos produtores, representaram apenas 11,16; 7,03 e 2,52%, respectivamente (SALES JUNIOR, et al., 2006). Os melões cultivados são resultantes não só da hibridação entre espécies em ambientes variáveis, mas também de programas intensivos de melhoramento genético (PIMENTEL; ALVES; FILGUEIRAS, 2000).

A cultura do meloeiro vem ao longo das duas últimas décadas substituindo as atividades agrícolas tradicionais no sertão, como cultivo de feijão, algodão e milho. A razão para isto é que a produção de frutos remunera melhor, trazendo maiores chances de

crescimento para os produtores, sendo atualmente uma das atividades que mais gera emprego e que mais contribui com o superávit da balança comercial no Brasil. Dentro deste contexto, essa cultura vem registrando, nos últimos anos, acréscimos significativos no País, tanto na área cultivada quanto na produtividade (PIMENTEL; ALVES; FILGUEIRAS, 2000). Essa expansão tem sido consequência da aplicação de tecnologias, das importantes propriedades nutricionais e do excelente sabor do fruto. Além disso, o aumento da área cultivada, a elevação do rendimento dos frutos por unidade de área e o desenvolvimento de novos materiais genéticos têm demandado melhorias nas práticas de manejo, além da preocupação com a proteção do meio ambiente e da saúde do produtor e do consumidor. Também existem vantagens econômico-financeiras proporcionadas pela elevada produção do meloeiro e pelas condições favoráveis à expansão dos mercados interno e, principalmente, externo em função do alto padrão de qualidade apresentado pelo fruto brasileiro. Em função de tais características, o Brasil é atualmente o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas do mundo, com um PIB agrícola da ordem de 11 bilhões de dólares, gerando quatro milhões de empregos diretos, só na fruticultura (SECEX/DATAFRUTA-IBRAF, 2005), e 60 mil empregos diretos e indiretos em cultivos de meloeiro na região Nordeste. Contudo, devido à exploração intensiva e extensiva dessa cucurbitácea houve a intensificação dos problemas fitossanitários, atualmente responsáveis pela diminuição da área plantada e significativas perdas econômicas (TAVARES, 2002).

O meloeiro apresenta uma vasta gama de doenças de origem microbiana, fisiológica e nutricional, ou causadas por fatores ambientais. De maneira geral, as doenças constituem um dos maiores entraves ao desenvolvimento da cultura, pois inibem iniciativas empresariais de produção e de exportação (VIANA et al., 2001). Contudo, as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides são as que despertam maior atenção, não

só pelo seu poder destrutivo, mas principalmente, pelos elevados prejuízos que resultam de sua ocorrência.

Meloidoginose do meloeiro

De acordo com Lucas e Sorribas (1994), os nematóides encontram-se entre os principais agentes infecciosos causadores de doenças em meloeiro. Na Venezuela esses pesquisadores verificaram em meloeiro a incidência de 74,8% de *Pratylenchus brachyurus* Godfrey, 20,9% de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira e 5% de *Meloidogyne incognita* Kofoid & White. Lima, Dias e Castro (1995) citaram como principais espécies ocorrentes na referida cultura: *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita*, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *Radopholus* sp. Thorne, *R. reniformis*, *Helicotylenchus nannus* Steiner e *Aphelenchus avenae* Bastian. Dentre as espécies de nematóides causadores de galhas, *M. incognita* e *M. javanica* são citadas como as mais importantes.

Em 1855, Berkeley classificou o nematóide das galhas como sendo *Heterodera radicicola*. Jebert, em 1877 no Rio de Janeiro, associou a presença de galhas em raízes de café (*Coffea arabica* L.) ao declínio da cultura, e Göeldi em 1887, classificou o nematóide das galhas como sendo *M. exigua* Göeldi. Esta foi a primeira vez que o nematóide das galhas foi chamado de *Meloidogyne*, mas esse gênero não foi imediatamente aceito pela comunidade científica (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001). Em 1949, Chitwood fez uma revisão completa e classificou as quatro principais espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*), separando-as pelas marcas cuticulares na região perineal. A partir daí, os nematóides das galhas foram

conhecidos mundialmente como gênero *Meloidogyne*. Desde então, mais de 80 espécies desse gênero já foram descritas (MOURA, 2005b).

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* apresentam machos e fêmeas facilmente distinguíveis morfológicamente (dimorfismo sexual). Os machos são vermiformes e medem de 1,2 a 1,5 mm de comprimento por 30 a 36 μm de diâmetro; as fêmeas, apresentam formato piriforme quando adultas e chegam a medir 0,40 a 1,3 mm de comprimento por 0,21 a 0,75 mm de largura (CARES; BLUM; ANDRADE, 2006).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. começa com o ovo, cujo interior sofre várias mudanças durante o desenvolvimento embrionário até culminar na formação do juvenil do primeiro estágio, ou J1. O J1 sofre uma ecdise e se torna J2 ainda dentro do ovo. O J2 perfura o ovo com o estilete, rompendo a casca e segue um gradiente de concentração de exsudatos radiculares (gradientes de pH e moléculas da superfície celular) que orienta o movimento até chegar à raiz onde penetra na região da zona de alongamento celular, logo atrás da coifa. Esta zona apresenta alto metabolismo por estar em diferenciação celular e, portanto, produz bastante exsudatos. As células possuem pouca quitina, suberina e celulose depositada em suas paredes e, por isso, são mais facilmente penetradas pelo J2 que migra para o tecido vascular e inicia a alimentação introduzindo substâncias nas células da planta, que irão alterá-las morfológica e fisiologicamente. Neste instante, o J2 adquire uma forma alargada tornando-se sedentário. Estas células especializadas da raiz, recebem o nome de células gigantes (AGRIOS, 2005; FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

As alterações causadas pelos nematóides não se restringem as células gigantes, isto é, as células do córtex se multiplicam desordenadamente e a raiz engrossa, formando um tumor que recebe o nome de galha. As mudanças celulares resultam em aumento da concentração de aminoácidos, proteínas, RNA e DNA nas células gigantes; em aumento de

exsudatos radiculares, minerais, lipídios, hormônio de crescimento, respiração e transpiração, seguido por um decréscimo de açúcares e celulose. Com a formação das células gigantes, ocorre também obstrução física dos vasos condutores de água e minerais, o que resulta em sintomas de murcha prematura e de deficiência de nutrientes, além do subdesenvolvimento da planta. Em seguida, o J2 sofre três ecdises, passando a J3, J4 e forma adulta fêmea ou macho. Quando o macho é formado, ele readquire a forma alongada, rompe a cutícula e abandona a raiz. O macho não se alimenta mais e, na maioria das espécies de *Meloidogyne*, não tem papel na reprodução, que é partenogenética. Quando a fêmea é formada, continua a engrossar até ficar quase esférica, completa o amadurecimento e inicia a postura de ovos em massa gelatinosa depositada do lado de fora do corpo. Geralmente a massa de ovos fica na superfície da galha e contém cerca de 500 ovos. Os J2 eclodem e penetram na mesma raiz ou em raízes vizinhas. A duração do ciclo de vida depende principalmente da temperatura podendo variar de duas a quatro semanas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

Segundo Freitas; Oliveira e Ferraz (2001), os sintomas mais característicos do parasitismo por nematóides do gênero *Meloidogyne* aparecem nas raízes e nos tubérculos. As raízes infectadas engrossam no ponto de penetração do juvenil, originando as galhas típicas, que são duas a três vezes mais grossas do que as partes não infectadas. Essas galhas não só privam as plantas de nutrientes, como também desfiguram e reduzem o valor comercial das culturas como batata e cenoura. Quando tubérculos ou outros órgãos comestíveis são infectados, apresentam protuberâncias na superfície, podendo se tornar proeminentes em alguns casos, causando deformidades e rachaduras na casca do órgão, induzindo significativas reduções na produtividade e no valor unitário de tubérculos (MOURA, 2005a). Em plantas susceptíveis, as infecções ocorrem ainda no estágio de

plântulas, resultando muitas vezes na completa destruição da cultura (AGRIOS, 2005). A planta infectada mostra crescimento reduzido e folhas pequenas de coloração verde palha ou amareladas, que murcham em períodos quentes do dia. Os frutos são pequenos, de baixa qualidade e a produção reduzida ou mesmo interrompida. A infecção também afeta as relações água × planta e o processo fotossintético (MELAKEBERHAN; BROOKE; WEBSTER, 1986). Outros sintomas associados à infecção como destruição de pêlos absorventes e redução da taxa de crescimento das raízes, limitam a exploração do solo e absorção de água e nutrientes, provocando o tombamento de plantas e as predispõem ao ataque de outros microrganismos (DIAS; RIBEIRO JUNIOR, 2001).

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* são considerados os mais importantes dentre a vasta gama de gêneros fitoparasitos por possuírem ampla distribuição geográfica e apresentarem extensa gama de hospedeiros, incluindo mais de 2000 espécies de plantas, dentre elas, diversas culturas de importância econômica e ervas daninhas, diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações de uma mesma espécie e por causar grandes danos às culturas chegando a ser fator limitante de cultivo como no caso do caupi (PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 2005) e da figueira (GALLETI; REZENDE, 2005).

De modo geral, as perdas na produção agrícola variam muito em função da planta hospedeira, das espécies de nematóides envolvidas, do sistema de cultivo e das condições edafo-climáticas, podendo ir de pequenas injúrias à morte de mudas ou plantas adultas, em decorrência do ataque direto do nematóide ou de associações com outros fitopatógenos (FREITAS, 2003).

No ano de 1994, em estados norte-americanos, perdas estimadas de produção causadas por nematóides em plantios de cucurbitáceas variaram de 0 a 10% do valor das culturas, sem que fossem levados em consideração os gastos com controle. A perda de

produção causada por *Meloidogyne* sp. em melão tipo Cantaloupe nos mesmos estados norte-americanos correspondeu a 10% do valor da cultura, equivalente a US\$ 224,3 milhões. Na Flórida, as espécies *Belonolaimus longicaudatus* Rau, *Meloidogyne* sp. e *R. reniformis* causaram juntas perdas de 3 a 5% em melão Cantaloupe e Honey Dew, melancia e pepino, no Texas, *Meloidogyne* sp. e *R. reniformis* foram responsáveis por 5 a 10% de perdas do valor das cucurbitáceas cultivadas (KOENNING et al., 1999).

Nas regiões tropicais, as perdas na produtividade de meloeiro decorrentes do parasitismo de fitonematóides têm variado de 18 a 33% (LUCAS; SORRIBAS, 1994). No Nordeste do Brasil, Lima; Dias e Castro (1995) citaram *Meloidogyne* spp. como fator limitante à produção de melão no município de Açu-RN, levando a perdas de até 100%. Moura; Pedrosa e Guimarães (2002) verificaram em áreas produtoras de melão nos municípios de Mossoró e Açu reduções crescentes de produtividade e altas infestações de *M. incognita*, *M. javanica* e *R. reniformis*.

O controle de fitonematóides é uma tarefa difícil devido a biologia e ao modo de dispersão do parasito. Desta forma, a utilização de técnicas eficientes de manejo é a única forma viável de reduzir as populações do nematóide a níveis inferiores àqueles capazes de causar prejuízos, sendo a prevenção da entrada do nematóide em áreas não infestadas e a prevenção da disseminação as principais medidas de controle (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001).

Nos últimos 100 anos, as práticas utilizadas para obter cultivos sadios têm se baseado na utilização de material de plantio sadio, isento de patógenos; utilização de área isenta de patógenos, com adequada fertilização; alta qualidade de água para irrigação e utilização de práticas de manejo protetoras e preventivas (COOKE, 2000). Embora nenhuma dessas táticas de manejo possa ser considerada revolucionária se aplicada

isoladamente, o seu manejo integrado tem contribuído para a redução da população de nematóides.

Atualmente, as estratégias de manejo de fitonematóides prioritárias são aquelas que diminuem custos, aumentam a produção e não agridem o ambiente. A utilização de matéria orgânica, o controle biológico, o uso de variedades resistentes, a solarização, a rotação de culturas, o pousio, a inundação, o uso de cultivos intercalares e a cobertura do solo são abordados, principalmente, por reduzir a população de nematóides e manter a biodiversidade nos diferentes agroecossistemas (FREITAS, 2003; ZASADA; FERRIS; ZHENG, 2002).

É importante ressaltar que cada vez mais a sociedade tem exigido práticas que visem substituir os nematicidas por produtos ou técnicas ecologicamente recomendáveis, visando causar menor impacto no ambiente que os métodos agrícolas convencionais. Isto tem incentivado a busca de métodos alternativos para o controle de fitonematóides (FERRAZ; SANTOS, 1995), principalmente para os gêneros de maior importância, como *Meloidogyne*. Dentro de uma abordagem integrada, o controle biológico vem sendo considerado uma das alternativas para assegurar o desenvolvimento sustentável da agricultura, podendo ser empregado também em conjunto com métodos tradicionais de controle (FREITAS, 2003). O princípio básico desta prática é fundamentado na ação exercida por determinados microrganismos, que eliminam, impedem ou reduzem o desenvolvimento de patógenos. Os agentes de biocontrole agem reduzindo a intensidade de inóculo ou a capacidade do patógeno em incitar doença.

No caso do biocontrole dos nematóides das galhas em meloeiro, o controle biológico é uma alternativa de grande importância devido à ausência de controle químico, uma vez que a utilização de nematicida para a cultura não é recomendada. Segundo Ducan

(1991) e Stirling (1991), a utilização desta prática pode seguramente reduzir a população de fitonematóides para limiares abaixo do nível de dano econômico, sendo potencialmente útil dentro das medidas duráveis de controle.

Entre os antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematóides estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, as bactérias parasitas obrigatórias, os fungos parasitas de ovos, os fungos predadores e parasitas de fêmeas e os fungos endomicorrízicos (SIKORA, 1992).

Fungos têm sido estudados no controle biológico de fitonematóides, entre os quais, *Acremonium strictum* Gams, *Allomyces anomalus* Emerson, *Arthrobotrys arthrobotryoides* (Berlese) Lindau, *Dactylella candida* (Nees) de Hoog & van Oorschot, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Verticillium* spp., entre outros. Também são relacionadas diversas espécies de bactérias (parasitas obrigatórias de nematóides, rizosféricas e endofíticas), como *Clostridium butyricum* Prazmowski, *Desulfovibrio desulfuricans* (Beijerinck) Kluyver & van Niel, *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr, *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces anulatus* (Beijerinck) Waksman; bem como nematóides predadores, tais como *Butlerius degrassi* Grootaert & Jaques, *Iotonchus amphigonius* (Thorne) Andrassy, *I. monhystera* (Cobb). Alguns microartrópodes como *Alliphis halleri* Canestrini, *Caloglyphus berlesei* Michael, *Entomobyroides dissimilis* Moniez e *Tyrophagus similis* Volgin são relacionados no controle biológico de diversos fitonematóides (FREITAS, 2003; SIKORA, 1992; STIRLING, 1991).

O uso de bactérias no controle de fitonematóides é um campo relativamente novo de pesquisa (FREITAS et al., 2005).

Rizobactérias e bactérias endofíticas como agentes de controle biológico de nematóides parasitos de planta

As plantas são colonizadas por uma diversidade de microrganismos rizosféricos e endofíticos, principalmente bactérias e fungos, os quais estabelecem relações não patogênicas com seus hospedeiros. Quando benéficas, tais associações podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças e às condições adversas do ambiente, como estresse hídrico (SILVA et al., 2006).

As rizobactérias incluem-se entre os organismos antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematóides por possuírem a capacidade de limitar a penetração dos nematóides nas raízes (SIKORA, 1988). Apresentam uma série de vantagens sobre os nematicidas ou mesmo sobre outros agentes de controle biológico: são de fácil produção em larga escala, fácil armazenamento, ocorrem em abundância nos solos, são adaptáveis à tecnologia de formulação e não requerem manipulação genética (COIMBRA et al., 2005; SIKORA; 1992). Podem ser aplicadas via tratamento de substrato, imersão de sistema radicular de mudas em suspensão bacteriana, rega da planta com suspensão bacteriana, imersão das sementes em suspensão ou peletização das sementes em alginato (FREITAS, 2003; MARIANO; SILVEIRA, 2005). Parasitismo, produção de substâncias nematicidas, indução de resistência sistêmica e modificação da rizosfera são os diferentes modos de ação apresentados por rizobactérias no controle de fitonematóides (CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998).

Zaveleta-Mejia e Van Gundy (1982) foram pioneiros em relatar reduções de danos causados por nematóides das galhas através da microbiolização de sementes com rizobactérias. Posteriormente, vários trabalhos foram desenvolvidos evidenciando

resultados promissores com o uso de rizobactérias no manejo de fitonematóides. *Pseudomonas fluorescens* Migula e *P. putida* Trevisan controlaram os nematóides *Meloidogyne* spp. e *Radopholus similis* Cobb em bananeira (*Musa* sp. L.), milho (*Zea mays* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (AALTEN et al., 1998). Também Hoffmann-Hergarten; Gulati e Sikora (1998) com o emprego de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. verificaram controle de *M. incognita* em tomateiro e alface (*Lactuca sativa* L.).

Siddiqui e Shaukat (2002) testaram dois isolados de rizobactérias: *Pseudomonas aeruginosa* Migula isolado IE-6Sp e *P. fluorescens* isolado CHAO no controle de *M. javanica*. O primeiro isolado reduziu em 42% a penetração do nematóide no sistema radicular de tomateiro e o segundo isolado, 29%. Coimbra et al. (2005) testaram 92 isolados de rizobactérias obtidos de diversas culturas contra *M. javanica*. Quarenta e sete isolados demonstraram exercer antagonismo ao nematóide. Desses, 34 isolados reduziram o número de galhas por planta, sendo que o maior número de isolados bacterianos eficientes foram obtidos da rizosfera de plantas de alface e de tomateiro. Segundo Freitas et al. (2005), de 264 isolados de rizobactérias obtidos de solo rizosférico de tomateiro avaliados no controle de *M. javanica* e *M. incognita*, apenas seis reduziram o número de galhas de *M. javanica* e nenhum teve efeito sobre *M. incognita*. Sousa et al. (2006) obtiveram redução de 68% no número de galhas/g de raiz e de 76,8% de massa de ovos/g de raiz, em mudas de tomateiro produzidas em substrato incubado com *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (Krainsky) Waksman & Henrici.

As rizobactérias Gram positivas e formadoras de endósporos do gênero *Pasteuria* Metchnikoff são consideradas por muitos pesquisadores como um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematóides, não só pela agressividade, mas também devido à rusticidade. Entre as vantagens destacam-se a sobrevivência prolongada dos

endósporos no solo, resistência ao calor e a dessecação, inocuidade ao homem e a outros animais, e o possível uso em conjunto com práticas culturais (BIRD; BRISBANE, 1988; SHARMA; VIVALDI, 1999). Contudo, a natureza obrigada de parasito, falta de mobilidade e dependência na dispersão por água, animais ou práticas de cultivo são os maiores empecilhos.

O termo endófito foi criado por Perotti, em 1926, em um trabalho pioneiro sobre interações plantas-microrganismos, ao observar a presença de bactérias em tecidos corticais de raízes de plantas sadias (HALLMANN et al., 1997). Conceitualmente, pode-se adotar que endofítico ou microrganismos endofíticos são aqueles que podem ser isolados de material vegetal desinfestado superficialmente, e que não causam danos à planta. Assim, podem estar incluídos como microrganismos endofíticos tanto colonizadores com comportamento neutro como simbioses, e ainda aqueles que colonizam ora endofiticamente ora epifiticamente (AZEVEDO, 1999).

Bactérias endofíticas caracterizam-se pela associação íntima com a planta hospedeira e, desta forma oferecem a vantagem de estarem completamente compatibilizadas com o hospedeiro, permitindo a utilização de plântulas já colonizadas por estirpes antes das etapas de cultivo comercial, evitando a necessidade do estabelecimento dos potenciais inoculantes. Também possuem características muito variáveis de especificidade, bem como de sobrevivência fora do ambiente endofítico, e encontram-se na maioria das famílias vegetais (DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995).

Segundo Oliveira; Urquiaga e Baldani (2003), o habitat endofítico possui características mais favoráveis à expressão de genes promotores de crescimento vegetal que a rizosfera, tais como alta disponibilidade energética e baixa competitividade com outras espécies. Isto possibilita a expressão de genes associados à promoção de crescimento

vegetal ao longo do ciclo da cultura da planta hospedeira sob menor influência de fatores ambientais. A capacidade de colonização de tecidos endofíticos por estes organismos apresenta-se relacionada a diversos fatores, sendo o principal a interação entre os genótipos do vegetal e do microrganismo.

Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil sobre o antagonismo de bactérias endofíticas a nematóides. Bactérias endofíticas de mucuna preta (*Mucuna pruriens* var *pruriens* L.) foram testadas para o controle de *M. incognita* e plantas de tomateiro tratadas com essas bactérias apresentaram aumento de até 79% na altura e 43% no peso total em relação ao tratamento sem bactérias. O número de ovos do nematóide foi 69 a 92% menor do que no controle e a redução de galhas atingiu 52% (TOMÉ et al., 2000). Naves; Campos e Sousa (2004) testaram 40 filtrados de isolados de bactérias endofíticas obtidos a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas sobre a motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de *M. javanica*. Dos isolados testados, sete imobilizaram os juvenis após 48 horas de exposição ao isolado. Os mesmos isolados, inibiram eficientemente a eclosão dos juvenis e dois provocaram a morte dos juvenis após 48 horas de exposição.

Atividade enzimática de plantas parasitadas por fitopatógenos

O reconhecimento do patógeno e a subsequente expressão de resistência ou susceptibilidade ocorrem somente quando os genes de resistência e avirulência/virulência estão combinados especificamente nos organismos em interação, fazendo com que o desenvolvimento de doenças seja exceção e não regra. Este padrão de relacionamento tem

sido observado na interação entre fungos, bactérias, vírus e nematóides e plantas hospedeiras (JAYNES et al., 1993).

A interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos de defesa da planta contra o patógeno, os quais são regidos por genes específicos (SBALCHEIRO, 2006). Estudos isoenzimáticos são utilizados em casos de estresse biótico ou abiótico, por estarem relacionados ao entendimento das mudanças metabólicas e mecanismos de defesa desencadeados nas plantas (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995). Estas enzimas agem como armas químicas de defesa contra o ataque de patógenos, além de algumas catalizarem a formação de barreiras físicas na planta. Assim, o estudo da ativação enzimática é essencial para melhor compreender os mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

Uma técnica bioquímica amplamente utilizada é o sistema de eletroforese com isoenzimas, que são definidas como diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, que ocorrem num mesmo organismo, com afinidade por um mesmo substrato. O resultado da presença de mais de um gene, codificando para cada uma das enzimas, indica que são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados num mesmo loco ou diferentes locos, respectivamente. A variação em certas isoenzimas pode ser importante na capacidade das plantas de sobreviverem em ambientes diversos. Assim, estresses que afetam o metabolismo da planta como nutrição, temperatura e infecções por patógenos influenciam a intensidade da atividade enzimática e podem refletir no surgimento de formas moleculares múltiplas, por ativação de genes (GOTTLIEB, 1982).

A eletroforese de isoenzimas fornece um meio de avaliação da variação genética. Existem, atualmente, muitas técnicas que ampliam o poder de detecção no nível de DNA, pois as isoenzimas exibem um potencial enorme para a aplicação em genética de plantas

(FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Apesar de a técnica de isoenzimas detectar apenas os eventos mutacionais, que alteram a carga elétrica das proteínas em regiões codificadoras, e de um número limitado de genes que se expressam em enzimas dependentes do estágio de desenvolvimento da espécie, tais técnicas são consideradas de custo baixo e de ótimos resultados. Outra vantagem é que os polimorfismos enzimáticos estão mais próximos da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA, por serem um produto intermediário da expressão do gene (TORGGLER; CONTEL; TORGGLER, 1995).

A informação básica ao se visualizar os dados enzimáticos é a de que diferenças na mobilidade de isoenzimas, em um campo elétrico, são resultantes das seqüências de DNA que codificam essas enzimas. Em virtude das propriedades catalíticas das enzimas, as isoenzimas, especialmente, podem refletir o estado metabólico e diferenciado das células (SCANDALIOS, 1979).

Dentre as isoenzimas mais frequentemente estudadas em plantas infectadas por fitonematóides podem ser citadas peroxidase, esterase, fosfatase ácida e malato desidrogenase. A peroxidase tem importante função metabólica na regulação iônica, ajuste osmótico e produção de NADPH, participa da fotorrespiração e atua na fixação de CO₂, sendo cada função dependente da localização da enzima dentro da planta (mitocôndrias, peroxissomas ou cloroplastos) (ALFENAS, 1998; ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1990). A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). A enzima fosfatase ácida tem função de hidrolisar os fosfomonoésteres de um grande número de reações químicas vegetais, entre elas, a formação de sacarose durante a fotossíntese (TANKSLEY, 1983). A malato desidrogenase catalisa a conversão de malato à oxaloacetato, tendo uma importante função

dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e outros compartimentos celulares, sendo geralmente de natureza constitutiva (SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000).

Alterações enzimáticas em plantas parasitadas por nematóides foram evidenciadas em várias pesquisas. Em estudos conduzidos por Molinari (1991), isoperoxidasas foram detectadas em raízes de tomateiro resistentes (cv. Rossol) e suscetível (cv. Roma VF), quando infectadas ou não por *M. incognita*, no entanto, a atividade destas enzimas foi expressa de forma diferente nas cultivares. Todas as plantas apresentaram naturalmente produção de isoperoxidasas quando não infestadas pelo nematóide, porém a infecção pelo parasito aumentou rapidamente a atividade destas enzimas na cultivar resistente, quando comparada com a suscetível. Maior expressão enzimática de esterase foi verificada em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) resistentes em comparação com seus parentais suscetíveis, após a infecção de raízes por *Heterodera avenae* Wollenweber (MONTES et al., 2003). Assis (2006) também verificou em plantas de alpinia (*Alpinia purpurata* (Vieill.) Schum) atividade isoenzimática de esterase, fosfatase ácida e peroxidase, no entanto, de maneira geral, a intensidade das bandas principalmente as da fosfatase ácida foi maior em plantas parasitadas.

Em função da importância econômica do nematóide das galhas para a cultura do meloeiro e dos poucos estudos sobre o controle biológico da meloidoginose e interação nematóide-planta, a presente pesquisa objetivou isolar e selecionar rizobactérias e bactérias endofíticas para o controle biológico da meloidoginose e avaliar a atividade isoenzimática de plantas de meloeiro parasitadas por *M. incognita* raça 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. London: 2005. p.825-874.

ALFENAS, A. C.(Ed.). **Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

AALTEN, P. M.; VITOUR, D.; BLANVILLAIN, S. R.; GOWEN, S. R.; SUTRA, L. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 357-361, 1998.

ASSIS, T. C. **Fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais em Pernambuco, determinação do número de amostras, efeito de indutores de resistência e avaliação de mecanismos envolvidos**. 2006, 105 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1999. p.117-137.

BIRD, A. F.; BRISBANE, P. G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. **Revue Nématology**, France, v. 11, n. 1, p. 75-81, 1988.

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELOS, M. A. S. A cultura do meloeiro. In: GOTO, R.; TIRELLI, S. W. (Ed.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido (condições subtropicais)**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1997. p. 161-193.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 285-327, 1998.

CARES, J. E.; BLUM, L. E. B.; ANDRADE, E. P. Nematologia vegetal: uma introdução. In: BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. (Ed.). **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. Brasília: Otimismo, 2006. p. 128-166.

CARNEIRO, J. F. **Produção e qualidade de frutos de melão Cantaloupe influenciadas pela poda e pelo tutoramento, em condições de estufa e de campo**. 2000, 102 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 2, p. 88-95, 2005.

COOKE, R. J. Advances on plant healthy management in the twentieth century. **Annual Review Phytopathology**, St. Paul, v. 38, p.95-116, 2000.

DATAFRUTA. **Exportação brasileira de frutas frescas**. Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas, 2005. Disponível em: <<http://www.famato.org.br/>>. Acesso em: 08 jan 2007.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Ed.). ***Azospirillum VI and related microorganisms***: genetics, physiology, ecology. Berlin: Springer, 1995, v. 37, p. 3-14.

DUNCAN, L. W. Current options for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 29, p.469-490, 1991.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isozyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 22, p. 10-15, 1990.

FAO. **FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION** 2005. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>. Acesso em 05 jan 2007.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. In: LUZ, W. C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: EMBRAPA, 1995. p. 283-314.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FILGUEIRA, F. A. R. Cucurbitáceas – a família da abóbora. In: **Manual de Olericultura**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. p. 191-252.

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

FREITAS, L. G. Controle biológico dentro do contexto de manejo integrado de nematóides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, suplemento, p. 24-30, 2003.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; FABRY, C. F. S.; MARRA, B. M.; COUTINHO, M. M.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 215-220, 2005.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a nematologia**. Viçosa: UFV, 2001. p. 32-39.

GALLETI, S. R.; REZENDE, J. A. M. Doenças da figueira (*Ficus carica* L.). 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.351-360.

GOMES JUNIOR, J.; MENEZES, J. B.; NUNES, G. H. S.; COSTA, F. B.; SOUZA, P. A. Qualidade pós-colheita de melão tipo cantaloupe, colhido em dois estádios de maturação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 50-55, 2001.

GOTTLIEB, L. D. Conservation and duplications of isozymes in plants. **Science**, Whashington, v. 216, p. 73-380, 1982.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HOFFMENN-HERGARTEN, S.; GULATI, M. K.; SIKORA, R. A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 105, n. 4, p. 349-358, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 97**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em 08 jan. 2007.

JAYNES, J. M.; NAGPALA, P.; DESTÉFANO-BELTRÁN, L.; HUANG, J. H.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, S. Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco plants confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, Whashington, v. 89, p. 43-53, 1993.

KOENNING, S. R.; OVERSTREET, C.; NOLING, J. W.; DONALD, P. A.; BECKER, J. O.; FORTNUM, B. A. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, Gainesville, v. 31, p. 587-618, 1999.

LIMA, R. D. A.; DIAS, W. P.; CASTRO, J. M. C. Doenças causadas por nematóides em cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, p. 57-59, 1995.

LUCAS, S. V; SORRIBAS, F. J. Enfermidades producidas por nematodos. In: RUÍZ, J. R. D.; JIMENEZ, J. G. **Enfermidades de las cucurbitáceas en España**. Madrid: Graficas Papallona, 1994. p. 93-98.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: R. L. R. Mariano, 2005. 184 p.

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

MOLINARI, S. Induction of isoperoxidase in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 23, n. 2, p. 254-258, 1991.

MONTES, M. J.; LÓPEZ-BRANÃ, I.; ROMERO, M. D.; SIN, E.; ANDRÉS, M. F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. A.; DELIBES, A. Biochemical and genetic studies of two *Heterodera avenae* resistance genes transferred from *Aegiops ventricosa* to wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 611-618, 2003.

MOURA, R. M. Doenças do inhame (*Dioscorea cayannensis* Lam. var. *rotundata* Poir.). 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, 2005a. v. 2, p. 415-419.

MOURA, R. M. Histórico da taxonomia dos nematóides. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 155-170, 2005b.

MOURA, R. M. M.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P. Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 01062, 2002.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 384-388, 2004.

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

OLIVEIRA, A. M.; GURGEL, A. F.; LIMA, L. C. R. Diagnóstico do agronegócio do melão (*Cucumis melo* L.) produzido em Mossoró/RN: estudo de caso em três empresas produtoras. **Holos**, Rio Claro, v. 21, p. 27-36, 2005.

PEDROSA, J. F. (Ed.). **Cultura do melão**. Mossoró: ESAM, 1997, 50 p.

PIMENTEL, C. R. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Mercado internacional: situação atual e perspectivas. In: ALVES, R. E. **Frutas do Brasil: Melão Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 9-12.

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.

SALES JUNIOR, R.; DANTAS, F. F.; SALVIANO, A. M.; NUNES, G. H. S. Qualidade do melão exportado pelo porto de Natal-RN. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 286-289, 2006.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILELLA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 158-166, 2005

SBALCHEIRO, C. C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006, 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Passo Fundo. Rio Grande do Sul, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: SCANDALIOS, J. G. **Physiological genetics**. New York: Academic Press, 1979. p. 107.

SECEX/DATAFRUTA-IBRAF, 2005. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>> Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

SHARMA, R. D.; VIVALDI, L. J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2065-2069, 1999.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 469–473, 2002.

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

SIKORA, R. A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 30, p. 245-270, 1992.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; NUNES, F. V. **Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 25 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38).

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

SPINOLA, M. C. M.; CICERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

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

TANKSLEY, S. D. **Isozymes**. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. 472 p.

TAVARES, S. C. C. H. (Ed.) **Melão**: fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 87 p. (Frutas do Brasil, 25).

TOMÉ, L. G. O.; FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; DIAS, C. R. Efeito de bactérias endofíticas de mucuna preta (*Mucuna pruriens* var. *pruriens*) em *Meloidogyne incognita* infectando tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, suplemento, p. 341, 2000.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas** - variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na Região Nordeste**. Fortaleza: Embrapa, 2001. 24 p. (Boletim Técnico, 12).

ZASADA, I. A.; FERRIS, H.; ZHENG, L. Plant sources of Chinese herbal remedies: laboratory efficacy, suppression of *Meloidogyne javanica* in soil, and phytotoxicity assays. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, p. 124-129, 2002.

ZEVALETA-MEIJIA, E.; VAN GUNDY, S. D. Effects of rhizobacteria on *Meloidogyne* infection. **Journal of Nematology**, Springs, v. 14, p. 475-476, 1982.

CAPÍTULO II

Isolamento e Seleção de Bactérias para o Controle da Meloidoginose em Meloeiro



Isolamento e Seleção de Bactérias para o Controle da Meloidoginose em Meloeiro

Jeane E de Medeiros¹, Elineide B da Silveira^{2*}, Rosa de L R Mariano^{1*}, Elvira M R Pedrosa^{3*}

^{1;3}UFRPE-Dep^{to}. Agronomia/Fitossanidade; ²Dep^{to} Biologia/Microbiologia; ³Dep^{to}. Tecnologia Rural, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-030, Recife, PE; E-mail: jeaneemedeiros@hotmail.com

*Bolsista Produtividade CNPq

RESUMO

Os principais objetivos deste trabalho foram isolar bactérias da rizosfera do meloeiro e selecionar rizobactérias e bactérias endofíticas para o controle da meloidoginose. A partir de amostras de solo de plantio comercial de meloeiro situado em Mossoró-RN, Brasil, foram obtidos 61 isolados de rizobactérias e testados juntamente com outros 56 isolados endofíticos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Plantas de meloeiro Amarelo cv. AF 682 com 10 dias tiveram o solo infestado com 1000 ovos por planta de *Meloidogyne incognita* raça 2. Dois dias antes da infestação do solo foram depositados em cada vaso 20 mL da suspensão bacteriana (0,7 A). Decorridos 60 dias, foram determinadas as biomassas frescas da parte aérea e das raízes, os índices de galhas e de massa de ovos e o fator de reprodução do nematóide. Dos 117 isolados testados, foram selecionados inicialmente os isolados endofíticos ENM7, ENM10 e ENM51 que reduziram

significativamente o índice de massa de ovos e/ou o índice de galhas. Contudo, quando testados novamente, separadamente ou em misturas, esses isolados não mantiveram a eficiência na redução dessas variáveis e *in vitro* também não afetaram a eclosão dos juvenis.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, *Cucumis melo*, rizobactérias, bactérias endofíticas, manejo.

ABSTRACT

Isolation and selection of bacteria for control of *Meloidogyne incognita* in melon

The main objectives of this work were to isolate bacteria from melon rhizosphere and to select rhizobacteria and endophytic bacteria for control of *Meloidogyne incognita* in melon. Sixty-one rhizobacteria isolates were obtained from rhizosphere soil samples collected in melon commercial fields located in Mossoró, state of Rio Grande do Norte, Brazil. These isolates were tested along with 56 endophytic obtained from the Culture Collection of Plant Bacteriology Laboratory - Federal Rural University of Pernambuco. Melon seedlings yellow type cv. AF 682 10 days old had their soil infested with 1000 eggs for plant of *Meloidogyne incognita* race 2. Two days before soil infestation 20 mL of bacterial suspension (0,7 OD) were deposited in each pot. After 60 days fresh biomass of shoot and root, gall index, egg mass index and nematode reproduction factor were determined. Among 117 isolates the endophytic ENM7, ENM10 and ENM51 were selected because they significantly reduced egg mass index and/or gall index.

However when tested again, separately or in mixtures, these isolates did not maintain their efficiency and besides they did not affect egg hatching *in vitro*.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, *Cucumis melo*, rhizobacteria, endophytic bacteria, management

(Recebido para publicação em.....)

Os nematóides encontram-se entre os principais agentes infecciosos causadores de doenças em meloeiro sendo responsáveis nas regiões tropicais por perdas de 18 a 33% em produtividade (Lucas & Sorribas, 1994). No Nordeste do Brasil, Lima *et al.* (1995) citaram *Meloidogyne* spp. como fator limitante à produção de melão no município de Açu no estado do Rio Grande do Norte, levando a perdas de até 100%. Esses dados são preocupantes porque o Nordeste é a principal região produtora e exportadora de melão, tendo registrado no ano de 2005 uma produção de 273,979 mil t, equivalente a 93,24% de todo melão produzido no país (IBGE, 2005).

O controle de fitonematóides é uma tarefa difícil devido à biologia e ao modo de dispersão do parasito. Desta forma, a utilização de técnicas eficientes de manejo é a única forma viável de reduzir as populações do nematóide a níveis inferiores àqueles capazes de causar prejuízos (Freitas *et al.*, 2001). Dentro dessas técnicas pode ser inserido o controle biológico. No caso do nematóide das galhas em meloeiro, o controle biológico é uma alternativa de grande importância uma vez que o controle químico com nematicidas não é recomendado para a cultura.

Entre os antagonistas mais propícios ao manejo da população de fitonematóides estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, as bactérias parasitas obrigatórias, os fungos parasitas de ovos, os fungos predadores e parasitas de fêmeas e os fungos endomicorrízicos (Sikora, 1992). O uso de bactérias no controle de fitonemátóides é um campo relativamente novo de pesquisa (Freitas *et al.*, 2005).

As rizobactérias incluem-se entre os organismos antagonistas mais promissores para o manejo da população de fitonematóides por possuírem a capacidade de limitar a penetração dos nematóides nas raízes (Sikora, 1988). Além disto, podem exercer efeitos benéficos ao desenvolvimento das plantas através da promoção de crescimento (Kloepper *et al.*, 1990).

Zaveleta-Meija e Van Gundy (1982) foram pioneiros em relatar reduções de danos causados por nematóides das galhas através da microbiolização de sementes com rizobactérias. Posteriormente, vários trabalhos foram desenvolvidos evidenciando resultados promissores com o uso de rizobactérias no manejo de fitonematóides. *Pseudomonas fluorescens* Migula e *P. putida* Trevisan controlaram os nematóides *Meloidogyne* spp. e *Radopholus similis* Coob em bananeira (*Musa* sp. L.), milho (*Zea mays* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Aalten *et al.*, 1998); Hoffmann-Hergarten *et al.* (1998) com o emprego de *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. verificaram controle de *M. incognita* (Treub) Chitwood em tomateiro e alface (*Lactuca sativa* L.). Siddiqui e Shaukat (2002) observaram a eficiência de *Pseudomonas aeruginosa* Migula IE-6Sp e *P. fluorescens* Migula CHAO no controle de *M. javanica* (Treub) Chitwood em tomateiro.

Apesar da pouca ênfase das pesquisas no Brasil, bactérias endofíticas também podem ser empregadas no controle da meloidoginose (Naves *et al.*, 2004). Esses organismos apresentam como vantagem a capacidade de viver no interior dos tecidos das plantas, escapando da competição com outros microrganismos do solo (Misaghi & Donndelinger, 1990).

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias e selecionar rizobactérias do meloeiro e bactérias endofíticas para o controle da meloidoginose.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de bactérias da rizosfera de meloeiro

Para o isolamento de bactérias foram coletadas 10 amostras de solo rizosférico (1kg) de plantas sem sintomas de meloidoginose no município de Mossoró-RN em áreas de produção de meloeiro com histórico da doença, segundo metodologia adaptada de Gomes *et al.* (2005). Em laboratório, após homogeneização, de cada amostra 1,0 g de solo foi colocado em Erlenmeyer contendo 99 mL de água destilada esterilizada. Após homogeneização, 1 mL da suspensão foi retirado, realizando-se em seguida uma série de diluições na base 10 até 10^{-3} . Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi pipetado em placas de Petri contendo meio de cultura NYDA (3,0 g extrato de carne; 5,0 g peptona; 10,0 g de glicose; 5,0 g extrato de levedura; 15,0 g ágar; 1000,0 mL de água destilada), sendo distribuído uniformemente na superfície do meio com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em B.O.D. (Demanda de Oxigênio Bioquímica) por 48 horas a temperatura de 30° C. As colônias que se apresentaram distintas umas das outras, de acordo com características macroscópicas de coloração da colônia

e de crescimento no meio, foram purificadas e preservadas pelo método da água esterilizada. Os isolados obtidos foram submetidos ao teste de coloração de Gram e crescimento em meio de King B (20,0 g proteose peptona; 15,0 g bacto ágar; 8,7 g glicerol; 1,5 g K_2HPO_4 ; 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1000,0 mL de água destilada). Foram também utilizados 56 isolados de bactérias endofíticas de diversos órgãos de plantas de meloeiro sadias, pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

Obtenção do inóculo de *Meloidogyne incognita* raça 2

O inóculo de *M. incognita* raça 2 foi oriundo de plantio comercial de meloeiro localizado no Rio Grande do Norte e mantido em condições de casa de vegetação em vaso cultivado com meloeiro Amarelo Ouro. O inóculo foi preparado conforme técnica descrita por Hussey & Barker (1973), e a concentração da suspensão ajustada para 1000 ovos por planta. A espécie do nematóide foi confirmada através de configuração perineal de fêmeas adultas e padrão isoenzimático. Para a confirmação da raça, foi realizado o teste de diferenciação de raças segundo Hartman & Sasser (1985).

Seleção de bactérias para biocontrole da meloidoginose

Plântulas de meloeiro Amarelo cv. AF 682 com 10 dias, cultivadas em vasos com capacidade para 100 mL contendo solo fumigado com brometo de metila, tiveram o solo infestado com 1000 ovos de *M. incognita* raça 2 por planta, os quais foram depositados em quatro perfurações de 2 cm de profundidade ao redor do colo da planta. Dois dias antes da infestação do solo, foi depositado em

cada vaso 20 mL da suspensão bacteriana, ajustada em espectrofotômetro a 570nm para absorvância 0,7. Três dias após a infestação do solo as mudas em torrão foram transplantadas para vasos de 500 mL contendo solo fumigado com brometo de metila. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a uma temperatura média de 29 ± 3 °C. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, com 119 tratamentos (117 bactérias, testemunha relativa e testemunha absoluta) e cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta. Decorridos 60 dias da infestação do solo, foram determinadas as biomassas frescas da parte aérea e das raízes, os índices de galhas e massa de ovos, ovos por sistema radicular e o fator de reprodução do nematóide (relação entre a população final e a população inicial de nematóides) de acordo com Hussey & Barker (1973). Para estimativa do índice de galhas e massa de ovos, foi utilizada a escala de notas do “International *Meloidogyne* Project” (Taylor & Sasser, 1978).

Três isolados bacterianos que reduziram os índices de galhas e massa de ovos foram submetidos a novo teste de biocontrole, separadamente ou em misturas, seguindo a metodologia citada anteriormente, e testados paralelamente quanto à eclosão de juvenis de *M. incognita* raça 2 *in vitro*. As suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro a 570nm para absorvância 0,7 e depositadas em recipiente plástico com 4 cm de diâmetro. Sobre a suspensão foi colocada uma peneira e sobre a peneira um disco de papel de filtro, o qual tangenciava a suspensão bacteriana seguindo o modelo do funil de Baermann modificado. Sobre o papel de filtro foram depositados 500 ovos de *M. incognita* raça 2, desinfestados superficialmente em câmara de fluxo laminar por meio da

imersão em sulfato de estreptomicina 0,1% por 5 minutos (Carneiro *et al.*, 1998) e lavados por três vezes em água destilada esterilizada, passando-se a suspensão através de peneiras de 500 meshes. Os recipientes foram cobertos com papel alumínio e mantidos em condições de laboratório a 25 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos (três isolados bacterianos, uma mistura dos isolados e uma testemunha), com quatro repetições. Após 48 horas, foi avaliada a porcentagem de J₂ eclodidos em caixas calibradas em microscópio estereoscópico.

Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ou Duncan ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 10 amostras de solo de rizosfera provenientes de campos de produção de melão em Mossoró-RN, foram obtidos 61 isolados bacterianos, selecionados entre as colônias que apareceram em maior quantidade e com coloração e aspecto de crescimento diferenciado dentro de cada solo. Verificou-se que 47,5% dos isolados eram Gram positivos, e nenhum dos isolados Gram negativos produziu pigmento fluorescente em meio de King B, indicativo de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente. *Pseudomonas* fluorescentes e não fluorescentes, bactérias Gram positivas do gênero *Bacillus* e *Pasteuria penetrans* Thorne estão frequentemente associados ao controle de nematóides (Freitas, 2001).

Nenhum isolado bacteriano testado incrementou significativamente ($P \leq 0,05$) as biomassas frescas da parte aérea e das raízes em relação às

testemunhas absoluta e relativa (dados não apresentados), e muitos apresentaram efeito deletério, com a diminuição dos valores dessas duas variáveis. Explicação para as reduções de biomassa de plantas pode ser a ocorrência de bactérias deletérias ou fitopatogênicas, ambas prejudiciais ao desenvolvimento da planta, as quais podem ter sido utilizadas nesse experimento. Segundo Luz (1996) e Schippers *et al.* (1987), além de benéficas às plantas as rizobactérias podem também ser prejudiciais ou neutras. Coimbra *et al.* (2005), verificaram redução no teor de matéria seca de plantas de tomateiro tratadas com rizobactérias, ao passo que Tomé *et al.* (2000) obtiveram incrementos em até 79% da altura e 43% do peso total das plantas de tomateiro tratadas com bactérias endofíticas de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*).

Embora as plantas tenham apresentado elevado índice de galhas de acordo com o critério estabelecido por Taylor & Sasser (1978), 43,59% dos isolados reduziu significativamente este índice em relação à testemunha relativa (Tabela 1), indicando que as bactérias retardaram o ciclo de vida de *M. incognita* raça 2. Por outro lado, as bactérias não afetaram a penetração dos nematóides uma vez que todas as plantas encontravam-se parasitadas. Respostas similares foram encontradas em pesquisas de controle biológico da meloidoginose em tomateiro. Coimbra *et al.* (2005) testando 92 isolados de rizobactérias obtidos de diversas culturas contra *M. javanica* e verificaram que 34 isolados reduziram o número de galhas por planta. Avaliando 264 isolados de rizobactérias obtidos de solo rizosférico de tomateiro no controle de *M. javanica* e *M. incognita*, Freitas *et al.* (2005) obtiveram apenas seis isolados eficientes na redução do número de galhas de *M. javanica*.

O índice de massa de ovos também foi elevado em todas as plantas avaliadas. Porém, 61,54% dos isolados bacterianos reduziram significativamente este índice, com destaque para os endofíticos ENM24 e ENM51, que diminuíram o valor dessa variável em 63,63% em relação à testemunha (Tabela 1). Redução de 68% no número de galhas por g de raiz e de 76,8% de massa de ovos por g de raiz foram obtidas em mudas de tomateiro inoculadas com *M. incognita* e produzidas em substrato incubado com *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* (Krainsky) Waksman & Henrici (Sousa *et al.*, 2006).

Apesar de alguns isolados terem reduzido os índices de galha e massa de ovos, o número de ovos por sistema radicular não foi reduzido significativamente, e alguns tratamentos estimularam a produção de ovos. Os fatores de reprodução obtidos variaram de 22.106 ovos por sistema radicular no tratamento ENM60 a 2.436 ovos por sistema radicular no tratamento ENM51, comparado com 6.712,4 ovos na testemunha relativa. Coimbra *et al.* (2005) testando 49 rizobactérias no controle de *M. javanica* em tomateiro verificaram que 69,38% dos isolados reduziram o número de galhas por grama de raiz, mas 6,12% aumentaram o número de ovos por grama de raiz.

Na primeira avaliação os isolados endofíticos ENM7, ENM9, ENM10 e ENM24 se destacaram com potencial para o controle da meloidoginose do meloeiro por terem reduzido significativamente o índice de galhas e índice de massa de ovos, e o isolado ENM51, por ter apresentado junto com o isolado ENM24 o menor índice de massa de ovos (Tabela 1). No entanto, os isolados ENM9 e ENM24 foram deletérios ao crescimento do meloeiro, reduziram as biomassas frescas da parte aérea e raiz, não sendo portanto testados novamente

no biocontrole. Os isolados ENM7, ENM10 e ENM51 são pertencentes ao gênero *Bacillus* e fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

Bactérias do gênero *Bacillus* e *Pasteuria* têm mostrado potencial no controle de nematóides de cistos da soja (*Heterodera* sp.) e das galhas (*Meloidogyne* sp.) em ampla gama de plantas hospedeiras. Algumas das principais vantagens do uso desses microrganismos está na sobrevivência prolongada no solo, resistência ao calor e a dessecação, a inocuidade ao homem e outros animais, e o possível uso em conjunto com práticas culturais de manejo de fitonematóides (Freitas & Carneiro, 2000).

Quando os isolados endofíticos ENM7, ENM10 e ENM51 foram testados novamente, separadamente e em misturas, não reduziram os índices de galhas e massa de ovos, não confirmando o biocontrole. *In vitro*, estes isolados também não afetaram a eclosão dos juvenis o que sugere a falta/ausência de uma ação direta de metabólitos tóxicos produzidos pelos isolados testados, os quais segundo Freitas (2001) seriam absorvidos pelo ovo, inativando o nematóide ou causando deformações que o impeçam de eclodir. Alguns trabalhos evidenciam a redução do número de isolados de rizobactérias eficientes em controlar fitonematoses quando se faz uma segunda seleção. Habe (1997) testando isolados da rizosfera de plantas de solanáceas em *M. incognita* raça 1 encontrou cerca de 10,3% de bactérias eficientes numa primeira avaliação, sendo que na segunda, realizada com os melhores isolados obtidos na primeira, esse número caiu para 3,8%. Também Racke & Sikora (1992) observaram a redução de isolados bacterianos eficientes no controle de *Globodera pallida* (Stone) Behrens

em batata (*Solanum tuberosum* L.), onde dos 179 isolados obtidos apenas 16 controlaram o nematóide na primeira avaliação, caindo para seis isolados numa segunda avaliação.

Uma das possíveis razões para a ausência de promoção de crescimento do meloeiro e controle da meloidoginose no presente trabalho foi o período de aplicação das bactérias no solo. Dois dias pode não ter sido tempo suficiente para colonização das raízes e produção de substâncias tóxicas inibidoras da eclosão e viabilidade dos juvenis (Freitas, 2001), o que foi comprovado no teste in vitro. Além da extensão desse período, um outro modo de aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas a ser testado é a bacterização de sementes. Isto porque, no processo de germinação são liberados exsudatos que propiciam vantagem seletiva na colonização e sobrevivência bacteriana nas raízes (Kloepper *et al.*, 1985).

Apesar da utilização de bactérias obtidas apenas de plantas e rizosfera de melão, os resultados não foram satisfatórios. Existem controvérsias se a especificidade é condição essencial para a eficiência das bactérias promotoras de crescimento, com relatos contra e a favor (Enebak *et al.*, 1998; Shishido & Chanway, 1999). No entanto, segundo Coimbra *et al.* (2005) uma maior diversidade de espécies de plantas, usadas para o isolamento das rizobactérias, aumenta a possibilidade de se encontrar isolados eficientes no controle de nematóides.

E, finalmente, a ausência de isolados eficientes no universo testado, não é incomum e pode ainda ser explicada pelo número de isolados testados. É conhecido que a porcentagem de rizobactérias eficientes na promoção de

crescimento é menor que 1% (Chen *et al.*, 1996). No entanto, seleções com percentuais de 3,8; 3,3 e 2,3% foram encontradas respectivamente por Freitas *et al.* (2005), Habe (1997) e Racke & Sikora (1992), em controle de nematóides, o que justifica a quantidade de isolados utilizados nesse trabalho.

Embora o potencial de controle biológico da meloidoginose em meloeiro não tenha sido demonstrado neste trabalho, novos estudos se fazem necessários, principalmente porque o controle químico não é recomendado para a cultura. Portanto, essa nova alternativa deve ser plenamente considerada dentro de uma abordagem integrada que assegure o desenvolvimento sustentável da agricultura.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora.

REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

AALTEN PM; VITOUR D; BLANVILLAIN SR; GOWEN SR; SUTRA L. 1998. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. *Letters in Applied Microbiology* 27:357-361.

CARNEIRO RMDG; SOUZA IS; BELARMINO LC. 1998. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 22:12-21.

CHEN Y; MEI R; LIU L; KLOEPPER JW. 1996. The use of yield increasing (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE RS;

GUPTA VK (eds). *Management of soil borne disease*. Ludhiana: Kalyani Publishers. p.165-184.

COIMBRA JL; CAMPOS VP; SOUZA RM. 2005. Rizobactérias antagonistas a *Meloidogyne javanica*. *Magistra* 17:88-95.

ENEBAK SA; WEI G; KLOEPPER JW. 1998. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. *Forest Science* 44:139-144.

FREITAS LG. 2001. Rizobactérias versus nematóides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7. *Anais...* Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. p. 25-35.

FREITAS LG; CARNEIRO RMDG. 2000. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. In: MELO IS; AZEVEDO JS (eds). *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. v.2. p. 91-125.

FREITAS LG; NEVES WS; FABRY CFS; MARRA BM; COUTINHO MM; ROMEIRO RS; FERRAZ S. 2005. Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. *Nematologia Brasileira* 29:215-220.

FREITAS LG; OLIVEIRA RDL; FERRAZ S. 2001. *Introdução a nematologia*. Viçosa: UFV. p. 32-39.

GOMES AM; MARIANO RLR; MICHEREFF SJ; SILVEIRA EB; ASSIS SMP. 2005. In: MARIANO RLR; SILVEIRA EB (eds). *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: UFRPE. p. 119-125.

HABE MH. 1997. *Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas – RPCP – no controle do nematóide das galhas Meloidogyne incognita em tomateiro*. Brasília: UNB. 109p (Tese mestrado).

HARTMAN KM; SASSER JN. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: BARKER KR; CARTER CC; SASSER JN (eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State Univ. Graphics. p.69-77.

HOFFMANN-HERGARTEN S; GULATI MK; SIKORA RA. 1998. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105:349-358.

HUSSEY RS; BARKER KR. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2005. 2007, 08 de Janeiro. *SIDRA 97: sistema IBGE de recuperação automática*. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>.

KLOEPPER JW; SCHER FM; LABIBERTÉ M; ZALESKA I. 1985. Measuring the spermosphere colonizing capacity of bacterial inoculants. *Canadian Journal of Microbiology* 31:926-929.

LIMA RDA; DIAS WP; CASTRO JMC. 1995. Doenças causadas por nematóides em cucurbitáceas. *Informe Agropecuário* 17:57-59.

LUCAS SV; SORRIBAS FJ. 1994. Enfermidades producidas por nematodos. In: RUÍZ JRD; JIMENEZ, JG. *Enfermidades de las cucurbitáceas en España*. Madrid: Graficas Papallona. p. 93-98.

LUZ WC. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:1-49.

NAVES RL; CAMPOS VP; SOUZA RM. 2004. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 29:384-388.

RACKE J; SIKORA RA. 1992. Isolation, formulation and antagonic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Soil Biology and Biochemistry* 24:521-526.

SCHIPPERS B; BAKKER AW; BAKKER PAHM. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25:339-358.

SHISHIDO M; CHANWAY CP. 1999. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth-promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Botany* 77:22-31.

SIDDIQUI IA; SHAUKAT SS. 2002. Rhizobacteria-mediated Induction of Systemic Resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Phytopathology* 150:469-473.

SIKORA RA. 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Med. Fac. Landbouww* 2:867-878.

SIKORA RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270.

SOUSA CS; SOARES ACF; GARRIDO MS; ALMEIDA GMCO. 2006. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1759-1766.

TAYLOR AL; SASSER JN. 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes*. Raleigh: North Carolina State University Graphics. 111p.

TOMÉ LGO; FREITAS LG; NEVES WS; DIAS CR. 2000. Efeito de bactérias endofíticas de mucuna presta (*Mucuna pruriens* var. *pruriens*) em *Meloidogyne incognita* infectando tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 25:341.

ZEVELETA-MEIJA E; VAN GUNDY SD. 1982. Effects of rhizobacteria on *Meoidogyne* infction. *Journal of Nematology* 14:475-476.

Tabela 1. Efeito de isolados bacterianos da rizosfera (RM) e endofíticos (ENM) de meloeiros no controle da meloidoginose, avaliado pelo índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos (IMO), 60 dias após a infestação do solo com ovos de *Meloidogyne incognita* raça 2

Tratamen to	Índices ¹		Tratamento	Índices		Tratamento	Índices	
	IG	IMO		IG	IMO		IG	IMO
T.absoluta	0,0c ²	0,0d	RM38	4,0a	3,4a	ENM18	3,8b	2,8b
T.relativa	5,0a	4,4a	RM39	3,6b	2,8b	ENM20	4,8a	3,2b
RM1	4,6a	3,8a	RM40	4,6a	3,6a	ENM21	3,4a	2,4b
RM2	4,6a	4,0a	RM41	4,6a	4,2a	ENM22	4,6a	3,6a
RM3	3,6b	3,2b	RM42	3,6b	3,0b	ENM23	4,0a	3,0b
RM4	3,4b	2,6b	RM43	4,0a	3,2b	ENM24	3,2b	1,6c
RM5	4,8a	3,4a	RM44	3,0b	2,6b	ENM25	4,4a	3,0b
RM6	3,2b	2,8b	RM45	4,0a	2,4b	ENM26	4,2a	2,6b
RM7	2,6b	2,2b	RM46	2,8b	2,4b	ENM27	4,0a	3,2b
RM8	2,8b	2,0c	RM47	3,6b	2,6b	ENM28	4,4a	3,4a
RM9	4,4a	3,6a	RM48	3,6b	2,6b	ENM29	3,2b	2,6b
RM10	4,6a	3,8a	RM49	4,2a	3,4a	ENM30	3,4b	2,2b
RM11	4,8a	4,2a	RM50	3,6b	3,0b	ENM31	2,4b	2,2b
RM12	3,8b	3,4a	RM51	2,8b	2,2b	ENM32	4,0a	2,6b
RM13	4,4a	4,0a	RM52	3,6b	2,4b	ENM33	3,2b	3,0b
RM14	5,0a	4,2a	RM53	3,2b	2,6b	ENM34	4,8a	3,6a
RM15	4,2a	2,8b	RM54	2,8b	2,4b	ENM35	1,0b	2,6b
RM16	2,6b	2,4b	RM55	2,8b	2,2b	ENM36	3,6b	2,4b
RM17	3,6b	3,0b	RM56	4,6a	3,4a	ENM37	2,4b	2,6b
RM18	3,8b	3,4a	RM57	3,4b	2,4b	ENM38	4,2a	2,8b
RM19	3,6b	2,8b	RM58	2,6b	2,8b	ENM39	3,4b	2,8b
RM20	4,2a	3,0b	RM59	4,4a	3,2b	ENM40	3,6b	3,2b
RM21	4,2a	2,6b	RM60	4,2a	3,4a	ENM41	4,6a	4,0a
RM22	2,6b	2,5b	ENM1	4,4a	4,4a	ENM42	3,4b	3,0b
RM23	4,4a	3,4a	ENM2	4,4a	4,0a	ENM43	2,4b	2,8b
RM24	4,8a	3,2a	ENM3	4,0a	3,8a	ENM44	3,4b	2,4b
RM25	4,0b	2,8b	ENM4	5,0a	4,4a	ENM46	4,4a	3,8a
RM26	3,4b	3,0b	ENM5	4,0a	3,6a	ENM47	3,6b	2,4b
RM27	3,4b	2,8b	ENM6	4,4a	3,8a	ENM51	4,0a	1,6c
RM28	2,6b	2,8b	ENM7	3,8b	2,4b	ENM52	4,6a	3,0b
RM29	4,6a	3,6a	ENM8	4,6a	3,8a	ENM53	4,6a	3,6a
RM30	4,8a	3,6a	ENM9	1,6b	2,2b	ENM54	4,4a	3,8a
RM31	4,8a	3,4a	ENM10	3,0b	2,8b	ENM55	4,0a	3,2b
RM32	3,2b	2,4b	ENM11	4,0a	3,0b	ENM56	4,6a	2,8b
RM33	4,6a	4,2a	ENM12	4,4a	4,2a	ENM57	4,6a	3,0b
RM34	4,6a	3,8a	ENM14	3,8b	3,0b	ENM58	4,6a	2,8b
RM35	3,8b	3,4a	ENM15	5,0a	3,8a	ENM59	3,6b	2,6b
RM36	4,8a	4,2a	ENM16	4,2a	3,2b	ENM60	4,6a	3,6a
RM37	4,0a	3,0b	ENM17	3,6b	3,2b	ENM61	4,2a	2,8b
C.V. (%)	16.5	21.8	-	16.5	21.8	-	16.5	21.8

¹ Índices calculados de acordo com Taylor & Sasser (1978).

² Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

CAPÍTULO III

Atividade Isoenzimática de Plantas de Meloeiro Parasitadas por *Meloidogyne incognita* Raça 2



Atividade Isoenzimática de Plantas de Meloeiro Parasitadas por

Meloidogyne incognita Raça 2

Jeane E. Medeiros¹, Elineide B. Silveira², Luiza S. S. Martins³, Elvira M. R. Pedrosa⁴ & Rosa L. R. Mariano¹

¹Departamento de Agronomia/Fitossanidade, ²Departamento de Biologia/Microbiologia,

³Departamento de Biologia/Genética, ⁴Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal

Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Dois Irmãos, Recife, PE,

e-mail: jeaneemedeiros@hotmail.com

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: Jeane E. de Medeiros

MEDEIROS, J.E.; SILVEIRA, E.B.; MARTINS, L.S.S.; PEDROSA, E.M.R.; MARIANO, R.L.R.

Atividade isoenzimática de plantas de meloeiro parasitadas por *Meloidogyne incognita* raça 2.

Fitopatologia Brasileira

RESUMO

O cultivo do meloeiro (*Cucumis melo*) no Brasil vem se expandindo nos últimos anos, com destaque para a região Nordeste. Contudo, devido à intensificação dos problemas fitossanitários, principalmente em decorrência do parasitismo por nematóides, tem se observado uma diminuição da área plantada e significativas perdas econômicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das isoenzimas α e β -esterase, peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase de

plântulas de meloeiro parasitadas por *Meloidogyne incognita* raça 2. Plantas de meloeiro Amarelo cv. AF 682, com dez dias de idade, tiveram o solo infestado com 500 ovos do nematóide por planta. Três dias após a infestação do solo, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade para 500 mL contendo solo fumigado, sendo mantidas em casa de vegetação. Aos 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 32 dias após a infestação do solo, foram realizadas coletas da terceira folha das plantas, as quais foram submetidas à eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida. Dos cinco sistemas isoenzimáticos estudados, apenas a β -esterase e a malato desidrogenase mostraram polimorfismo entre as bandas expressas pelas amostras das plantas parasitadas por nematóides, quando comparadas às plantas testemunhas. A presença do nematóide inibiu a expressão de alguns genes β -esterase e ativou a expressão de outros da malato desidrogenase. Esses sistemas mostraram-se eficientes para estudos de resistência de plantas de meloeiro a *M. incognita* raça 2.

Palavras-chave adicionais: *Cucumis melo*, parasitismo, nematóide, galhas.

ABSTRACT

Isozymatic activity of melon plants parasitized by *Meloidogyne incognita* race 2

In Brazil melon (*Cucumis melo*) crop has been spread in the last years especially in the Northeastern Region. However, the intensification of diseases and pests, mainly the nematode parasitism, has lead to a reduction of planted area and significant economic losses. The objective of this paper was to evaluate the activity of the isozymes α and β -esterase, peroxidase, acid phosphatase and malate dehydrogenase in melon plants parasitized with *Meloidogyne incognita* race 2. Seedlings of melon type Yellow cv. AF 682, 10 days old, had their soil infested with 500 nematode eggs per plant. Three days after soil infestation, seedlings were transplanted to 500 mL-pots filled with fumigated soil, and maintained in greenhouse. At 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 32 days after soil infestation the third leaf of each plant was collected and processed for electrophoresis of

isozymes in polyacrilamide gel. From the five systems studied only β -esterase and malate dehydrogenase showed polymorphism between bands expressed by plants parasitized by nematodes when compared to the control plants. The nematode inhibited the expression of some β -esterase genes and activated the expression of other malate dehydrogenase genes. These systems were efficient for studying plant resistance of melon to *M. incognita* race 2.

Additional keywords: *Cucumis melo*, parasitism, nematode, root-knot.

INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro, o cultivo de meloeiro (*Cucumis melo* L.) vem crescendo rapidamente nos últimos anos. A região concentra 99,5% da produção nacional, registrando crescimento expressivo em alguns estados, a exemplo do Ceará, segundo maior produtor nacional, superado apenas pelo Rio Grande do Norte, que se destaca como líder nacional de produção e exportação de melão (IBGE, 2005; Sales Junior *et al.*, 2006). A produção de melão no Rio Grande do Norte se concentra no Agropólo de Mossoró-Açu, que abrange outros municípios como Baraúna, Apodi, e os da região conhecida como Baixo Açu (Oliveira *et al.*, 2005).

Os nematóides encontram-se entre os principais agentes infecciosos causadores de doenças em meloeiro, incitando perdas na produtividade que variam de 18 a 33% nas regiões tropicais (Lucas & Sorribas, 1994). No Nordeste do Brasil, Lima *et al.* (1995) citaram *Meloidogyne* spp. como fator limitante à produção de melão no município de Açu, levando a perdas de até 100%. Moura *et al.* (2002) detectaram em áreas produtoras de melão nos municípios de Mossoró e Açu, reduções crescentes de produtividade e altas infestações de *M. incognita* (Treub) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *Rotylenchulus reniformis* Linfod & Oliveira.

A interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos onde os genes de alerta de defesa da planta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática (Moraes, 1998). Estudos isoenzimáticos são utilizados em casos de estresse biótico ou abiótico, por estarem relacionados ao entendimento das mudanças metabólicas e mecanismos de defesa desencadeados nas plantas (Torggler *et al.*, 1995).

Uma técnica bioquímica amplamente utilizada em resposta a estresse sofrido por plantas, é o sistema de eletroforese com isoenzimas, que são definidas como diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, que ocorrem num mesmo organismo, com afinidade por um mesmo substrato, fornecendo um meio de avaliação da variação genética. Existem, atualmente, muitas técnicas que ampliam o poder de detecção ao nível de DNA, entretanto as isoenzimas que resultaram da expressão gênica, exibem um potencial enorme para a aplicação em genética de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As técnicas de isoenzimas detectam também os eventos mutacionais, que alteram a carga elétrica das proteínas em regiões codificadoras, e de um número limitado de genes que se expressam em enzimas dependentes do estágio de desenvolvimento da espécie, tais técnicas são consideradas de custo baixo e de ótimos resultados. Outra vantagem é que os polimorfismos enzimáticos estão mais próximos da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA, por serem um produto intermediário da expressão do gene (Torggler *et al.*, 1995).

A eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada para avaliar alterações enzimáticas em plantas parasitadas por nematóides em vários patossistemas a exemplo de tomateiro, trigo e alpínia (Molinari, 1991; Montes *et al.*, 2003; Assis, 2006), estando esterase, peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase entre as isoenzimas mais estudadas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das isoenzimas esterase, peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase de plantas de meloeiro parasitadas por *M. incognita* raça 2.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de meloeiro Amarelo híbrido AF 682, com dez dias de idade, cultivadas em vasos com capacidade para 100 mL contendo solo fumigado com brometo de metila, tiveram o solo infestado com 500 ovos de *M. incognita* raça 2 por planta, os quais foram depositados em quatro perfurações de 2 cm de profundidade ao redor do colo da planta. Três dias após a infestação do solo com os ovos do nematóide, as plantas em torrão foram transplantadas para vasos com capacidade para 500 mL contendo solo fumigado. Como testemunhas, foram utilizadas plantas cultivadas em solo não infestado com o patógeno. Foram realizadas sete coletas da terceira folha de cada planta correspondendo a 2, 4, 6, 8, 16, 24 e 32 dias após a infestação do solo. Em seguida, as folhas foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -20 °C.

Para extração das enzimas foram analisados 0,3 g de folhas previamente lavadas em água corrente e o excesso de água retirado com papel toalha. Durante o processo de extração, as amostras permaneceram à baixa temperatura, para evitar a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, perda da atividade enzimática. A trituração foi manual, em almofariz de porcelana. Ao material macerado foram adicionados 2 mL de solução extratora [Sacarose (0,2M) 2 g; PVP-40 (2,56%) 2 g; EDTA (5%) 1 g; 2-Mercaptoetanol (0,2%) 1 mL e tampão Tris-HCl (pH 8,0) (Trizma base (99,9%) 12,11 g; ácido clorídrico (37%) para titular e 500 mL de água destilada]. A adição de sacarose e 2-mercaptanol teve por objetivo proteger as enzimas contra efeitos de metabólicos secundários liberados pela ruptura dos tecidos (Scandalios,1969). As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 4 min. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram aplicadas aos poços dos géis de poliacrilamida a 7%. As placas de gel de poliacrilamida a 7% AA/BIS (acrilamida e bis-acrilamida-solução estoque) foram preparadas pela homogeneização de 17 mL da solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida em 7 mL de tampão borato de lítio 0,2 M, pH 8,3 e 67 mL de tampão tris-citrato 0,2 M, pH 8,3. À mistura foram adicionados 75 µL de TEMED (tetrametildiamina) e 0,75 mL de persulfato de amônia a 18%. Em seguida, a mistura foi vertida no molde de vidro até a

polimerização completa do gel, o qual foi colocado numa cuba horizontal contendo tampão borato de lítio, fazendo-se uso de tecido perfex como ponte de conexão.

A migração eletroforética foi conduzida a 4 °C, a um potencial de 40 V, até que a linha de front atingisse 7,5 cm em direção ao pólo positivo marcada com azul de bromofenol. Para a resolução dos sistemas enzimáticos, adotou-se os procedimentos baseados na metodologia proposta por Scandalios (1969) e/ou Alfenas (1998), com algumas modificações. Para detecção de α -esterase (α -EST) os géis foram corados usando-se 3,0 mL de α -naftil acetato 1%, em acetona 50%; 40 mg de fast blue RR salt; 50 mL de tampão fosfato de sódio monobásico 0,2 M, pH 4,2; 10 mL de tampão fosfato de sódio dibásico 0,2 M, pH 9,2; e 40 mL de água destilada, sendo em seguida incubados por 2 horas, no escuro, a 35 °C. Na revelação do sistema β -esterase (β -EST) o procedimento citado foi repetido, substituindo-se o α -naftil por β -naftil. Para a detecção de fosfatase ácida (ACP), fez-se uso de 100 mg de α -naftil fosfato ácido de sódio; 100 mg de fast garnet GBC salt; 1 mL de $MgCl_2$ a 1%; e 100 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. Em seguida, os géis foram incubados a 37 °C por 2 horas. O sistema peroxidase (PO) foi revelado usando-se 0,065 g de 3-amino-9-etilcarbazole; 5,0 mL de dimetilformamida; 2 mL de $CaCl_2$; 4 gotas de H_2O_2 a 30%; e 85 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. A coloração ocorreu no escuro a temperatura de 25 °C, por 2 horas. Na detecção de malato desidrogenase (MDH), para solução de revelação foi usado solução Tris 0,1M, pH 7,5 com 1,5 mL de DL-malato 1 M, pH 7,5; 15 mg de NAD^+ ; 2 mg de PMS; e 10 mg de MTT, sendo os géis colocados a 30 °C por 15 a 60 min ou até o aparecimento das bandas. Nas cubas, para as corridas eletroforéticas, foi utilizado tampão borato de lítio 0,2 M, pH 8,3 para as cinco enzimas estudadas. Todos os géis, após a coloração, foram lavados, fixados (em solução contendo álcool metílico, ácido acético e água destilada na proporção de 1:1:1v/v) por 20 min, avaliados para a confecção dos zimogramas e em seguida fotografados.

A interpretação dos zimogramas foi realizada através da identificação de bandas em *loci* gênicos relacionados com o parasitismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas de meloeiro parasitadas ou não por *M. incognita* raça 2 revelaram resposta enzimática para os cinco sistemas estudados, α -esterase (α -EST), β -esterase (β -EST), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO). Um total de 13 alelos (bandas eletroforéticas) foram identificados e analisados, sendo que o número de alelos variou de um para o sistema peroxidase, até um máximo de quatro para o sistema β -esterase, sem haver diferença na mobilidade das bandas em todos eles. De acordo com Scandalios (1969), o sistema isoenzimático de esterase é constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas com uma ampla gama de substratos específicos, sendo as variantes destas proteínas encontradas em plantas, geralmente monoméricas ou diméricas (Weeden & Wendel, 1990), com alto nível de variabilidade (Gillespe & Langley, 1974; Weeden & Wendel, 1990), constituindo-se um dos sistemas enzimáticos mais polimórficos. A classificação das esterases é feita de acordo com suas afinidades para α ou β naftil acetato, sua mobilidade em gel de acrilamida ou amido e sua seqüência de nucleotídeos (Hemingway & Karunaratine, 1998).

A revelação do sistema α -esterase (Figura 1) mostrou-se monomérico e monomórfico para os três locos observados (α -Est-1, α -Est-2 e α -Est-3), não constatando-se diferenças na expressão dos alelos nas plantas de meloeiros parasitadas ou não, durante todo o período de avaliação. A β -esterase (Figura 1) apresentou diferença qualitativa (presença e ausência de banda) quando comparadas plantas parasitadas e não parasitadas. Foram detectadas duas regiões de bandas para as plantas parasitadas por nematóides, em todos os períodos de contato (β -Est-1 e β -Est-4) e quatro regiões para as testemunhas (β -Est-1, β -Est-2, β -Est-3 e β -Est-4), constatando-se assim que a resposta de resistência pode estar relacionada com os dois alelos não expressos nas plantas parasitadas. Os resultados discordam dos obtidos por Assis (2006) que verificou uma maior expressão de respostas de esterase em plantas de alpinia (*Alpinia* sp. L.) parasitadas por *M.*

incognita do que as não parasitadas. No entanto, Montes *et al.* (2003) verificaram maior expressão enzimática de esterase em plantas de trigo (*Triticum* sp. Lam.) resistentes em comparação com os seus parentais suscetíveis, após a infecção de raízes por *Heterodera avenae* Wollenweber. A esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídios, como os fosfolipídios totais de membrana (Santos *et al.*, 2005).

A enzima fosfatase ácida, que tem função de hidrolisar os fosfomonoésteres de um grande número de reações químicas vegetais, entre elas, a formação de sacarose durante a fotossíntese (Tanksley, 1983), mostrou-se monomórfica com a expressão de dois alelos (Acp-1 e Acp-2) para todas as amostras analisadas sem diferenciação na intensidade das bandas (Figura 1). Este número de alelos expressos é inferior ao encontrado por outros autores, como Rios *et al.* (2004), com cinco alelos, Gomes *et al.* (2004), com três alelos, e Malone *et al.* (2005) com três e quatro alelos, ao estudarem padrões isoenzimáticos de fosfatase ácida em pepino (*Cucumis sativus* L.), banana (*Musa* sp. L.) e arroz (*Oryza Sativa* L.), respectivamente. Estudos realizados com plantas de alpinia parasitadas por *M. incognita* revelaram uma alta expressão de fosfatase ácida, que diferiu acentuadamente de plantas não parasitadas (Assis, 2006). Embora não tenham sido verificadas alterações nos padrões dessa isoenzima na presente pesquisa, a fosfatase ácida é considerada um excelente marcador devido a sua atividade para genes de resistência em plantas (Van Daelen *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1999), no entanto a participação dessa enzima na patogênese ou resposta da planta a infecção não está clara (Assis, 2006).

A peroxidase tem importante função metabólica na regulação iônica, ajuste osmótico e produção de NADPH, participa da fotorespiração e atua na fixação de CO₂, sendo cada função dependente da localização da enzima dentro da planta (mitocôndrias, peroxissomas ou cloroplastos) (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990; Alfenas, 1998). A atividade enzimática deste sistema mostrou-se monomórfica, com apenas um loco expresso (Po-1), onde as amostras N2 (planta parasitada) e T2 (planta testemunha) não apresentaram atividade da enzima (Figura 1). Observou-se também alteração na intensidade da banda, sendo que na amostra N7, planta parasitada por *M.*

incognita, a banda foi menos intensa do que na amostra T7, da planta testemunha. Em estudos conduzidos por Molinari (1991), isoperoxidasas foram detectadas em raízes de tomateiros resistentes (cv. Rossol) e suscetíveis (cv. Roma VF), quando infectadas ou não por *M. incognita*, porém a infecção pelo parasito aumentou rapidamente a atividade destas enzimas na cultivar resistente, quando comparada com a suscetível. Embora não tenham sido verificadas diferenças nos padrões da peroxidase entre plantas parasitadas ou não por *M. incognita*, Venere (1980) e Mellon (1991) relataram que alterações nos níveis de peroxidase e distribuição de isoformas são conhecidas por acompanhar processos de mecanismos de defesa dos hospedeiros a patógenos, como lignificação e suberização.

No sistema malato desidrogenase, foi evidenciado uma variação na expressão de dois dos três alelos identificados (Figura 1). O loco Mdh-2 mostrou-se ativo em todos os indivíduos. No tratamento sem nematóide, no loco Mdh-1 o alelo não se expressou nas testemunhas T1, T2, T3, T5 e T6 (2, 4, 6, 8, 16 e 24 dias) e no loco Mdh-3, em T1 e T6. Nas plantas parasitadas, a detecção dos alelos Mdh-1 e Mdh-3 ao longo dos 32 dias de análise sugere a ativação de genes que podem estar relacionados a mecanismos de defesa da planta ao patógeno. Silva *et al.* (2000) verificaram que a infecção de sementes de milho com os fungos *Aspergillus flavus* Link, *Fusarium moniliforme* Sheld e *Penicillium* sp. promoveram alterações, tanto na intensidade quanto no número de bandas, dos padrões eletroforéticos da isoenzima malato desidrogenase. Essa isoenzima atua no ciclo de Krebs, catalisando a reação de malato a ácido oxalacético (Weeden & Wendel, 1990).

Dos cinco sistemas isoenzimáticos estudados, apenas a β -esterase e a malato desidrogenase mostraram polimorfismo entre as bandas expressas, quando comparadas amostras de plantas parasitadas e não parasitadas por *M. incognita* raça 2, permitindo identificar o estado metabólico e diferenciado das células durante o processo de parasitismo. Portanto, esses sistemas mostraram-se eficientes para estudos de resistência de plantas de meloeiro a *M. incognita* raça 2. Sugere-se a continuidade das observações de outros sistemas isoenzimáticos na busca de mais correlações entre esses marcadores e a resposta da planta submetida a estresses bióticos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C. Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 1998.

ASSIS, T.C. Fitonematóides associados a Zingiberales ornamentais em Pernambuco, determinação do número de amostras, efeito de indutores de resistência e avaliação de mecanismos envolvidos. Tese de Doutorado. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. Isozyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15. 1990.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3nd ed. Brasília. 1998.

GILLESPE, J.H. & LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics* 76:837-887. 1974.

GOMES, E.W.F., WILLADINO, L., MARTINS, L, S.S., SILVA, S.O & CAMARA, T.R. Diplóides (AA) de bananeira submetidos ao estresse salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:525-531 2004.

HEMINGWAY, J. & KARUNARATNE, S.H.P.P. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12:1-12. 1998.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA. 2005. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 08 de janeiro de 2007.

LIMA, R.D.A., DIAS, W.P. & CASTRO, J.M.C. Doenças causadas por nematóides em cucurbitáceas. *Informe Agropecuário* 17:57-59. 1995.

LUCAS, S.V. & SORRIBAS, F.J. Enfermidades producidas por nematodos. In: Ruíz, J.R.D. & Jimenez, J.G. (Eds.). España. Graficas Papallona. 1994. pp. 93-98.

MALONE, G., ZIMMER, P.D., CASTRO, A.S., CARVALHO, I.L., MENEGHELLO, G.E. & PESKE, S.T. Identificação do estágio adequado para realização de análises isoenzimáticas em arroz. *Revista Brasileira de Sementes* 28:193-200. 2005.

MELLON, J.E. Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. *Plant Physiology* 95:14-20. 1991.

MOLINARI, S. Induction of isoperoxidase in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 23:254-258. 1991.

MONTES, M.J., LÓPEZ-BRANÑ, I., ROMERO, M.D., SIN, E., ANDRÉS, M.F., MARTÍN-SÁNCHEZ, J. A. & DELIBES, A. Biochemical and genetic studies of two *Heterodera avenae*

resistance genes transferred from *Aeglops ventricosa* to wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 107:611-618. 2003.

MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 6:261-284. 1998.

MOURA, R.M.M., PEDROSA, E.M.R. & GUIMARÃES, L.M.P. Nematoses de alta importância econômica da cultura do melão no estado do rio Grande do Norte, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 27:1062. 2002.

OLIVEIRA, A.M., GURGEL, A.F. & LIMA, L.C.R. Diagnostico do agronegócio do melão (*Cucumis melo* L.) produzido em Mossoró/RN: estudo de caso em três empresas produtoras. *Holos* 21:27-36. 2005.

RIOS, P.R.P., SILVEIRA, E.B., MARTINS, L.S.S., SILVA NETO, E.B. & GOMES, A.M.A. Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium* de pepino com base em marcadores isoenzimáticos. *Horticultura Brasileira* 22:729-733. 2004.

SALES JUNIOR, R., DANTAS, F.F, SALVIANO, A.M. & NUNES, G.H.S. Qualidade do melão exportado pelo porto de Natal-RN. *Ciência Rural* 36:286-289. 2006.

SANTOS, C.M.R., MENEZES, N.L. & VILELLA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes* 27:104-114. 2005.

SCANDALIOS, J.G. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.). New York. Academic Press. 1969.

SILVA, E.A.A., VON PINHO, E.V.R., VIEIRA, M.G.G.C.; CARVALHO, M.L.M. & MACHADO, J.C. Alterações dos padrões de enzimas em sementes de milho infectadas por fungos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 23:1725-1732. 2000.

TANKSLEY, S.D. *Isozymes. Part B.* Amsterdam. Elsevier, 1983.

TORGGLER, M.G.F., CONTEL, E.P.B. & TORGGLER, S.P. Isoenzimas – variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 1995.

VAN DAELEN, R.A.J.J., GERBENS, F., VAN RUISSEM, F., AARTS, J., HONTELEZ, J. & ZABELL, P. Long-rang physical maps of two loci (Aps-1 and GP79) flanking the root-knot nematode resistance gene (Mi) near the centromere of tomato chromosome 6. *Plant Molecular Biology* 23:185-192. 1993.

VENERE, R.J. Role of peroxidase in cotton resistance to bacterial blight. *Plant Science* 20:47-56. 1980.

WEEDEN, N.F. & WENDEL, J.F. Genetics of plant isozymes. In: Soltis, D.E. & Soltis, P.S. (Eds.). *Isozymes in plant biology.* London. Chapman and Hall. 1990. pp. 46-72.

ZHONG, X.B., BODEAU, J., FRANZ, P.F., WILLIAMSON, V.M., VAN KAMMEN, A., JONG, J.H. & ZABEL, P. FISH to meiotic pachytene chromosome of tomato locates the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of

euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively.

Theoretical and Applied Genetics 98:365-370. 999.

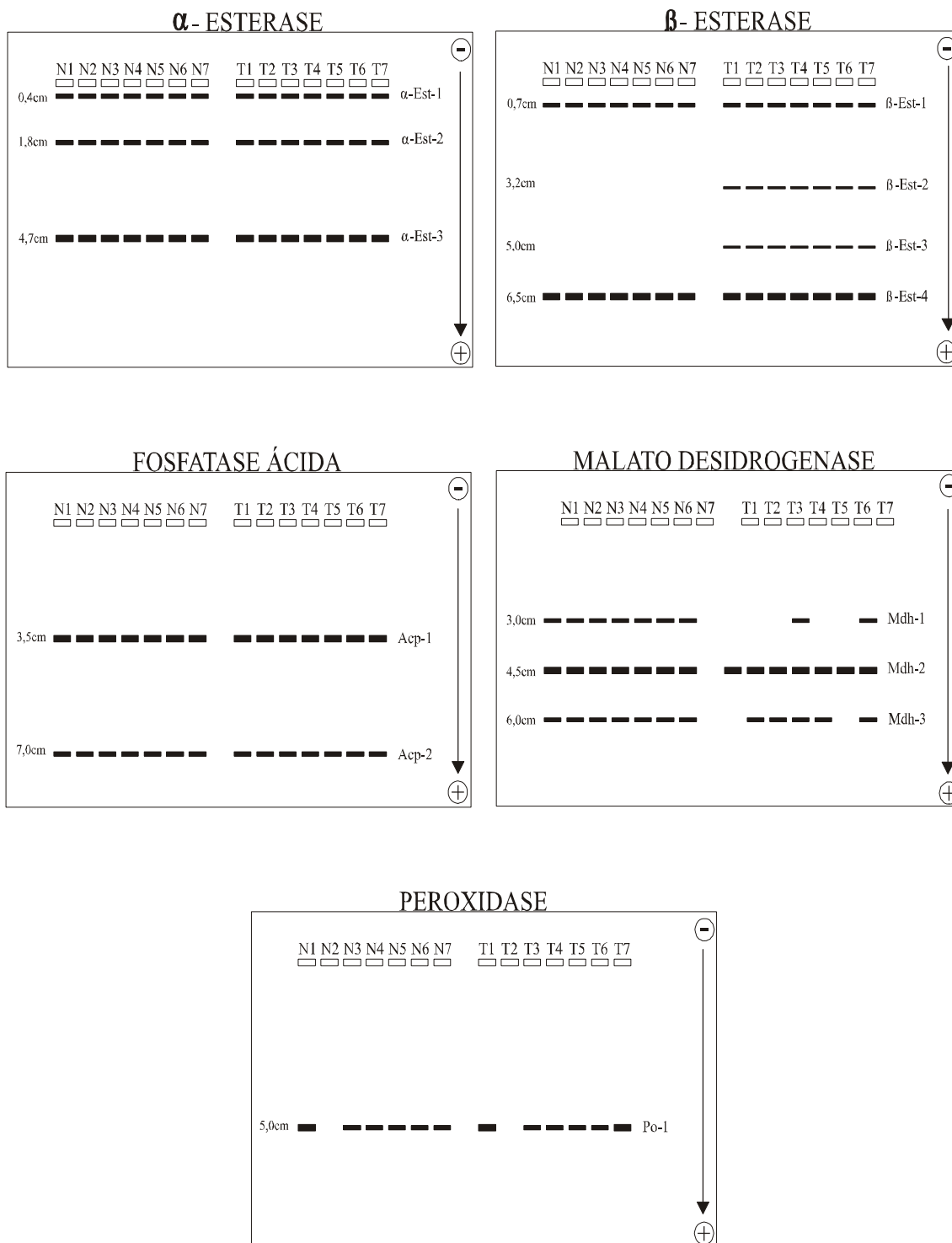


Figura 1- Zimogramas das isoenzimas α e β -esterase, peroxidase, fosfatase ácida e malato desidrogenase de plantas de meloeiro parasitadas (N) ou não (T) por *Meloidogyne incognita* raça 2, nos períodos de 2 (N1 e T1), 4 (N2 e T2), 6 (N3 e T3), 8 (N4 e T4), 16 (N5 e T5), 24 (N6 e T6) e 32 (N7 e T7) dias após a infestação do solo.

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

1. Plantas de meloeiro parasitadas ou não por *Meloidogyne incognita* raça 2 apresentaram resposta enzimática para os sistemas α -esterase (α -EST), β -esterase (β -EST), fosfatase ácida (ACP), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (PO).
2. A presença de *M. incognita* raça 2 em plantas de meloeiro inibiu a expressão de genes β -esterase e ativou a expressão da malato desidrogenase.
3. Rizobactérias e bactérias endofíticas foram neutras ou deletérias à biomassa fresca de plantas de meloeiro sadias ou parasitadas por *M. incognita* raça 2.
4. Os isolados de rizobactérias e bactérias endofíticas testados não apresentaram potencial para o controle da meloidoginose em meloeiro.