

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL

ESPÉCIES DE *Bacillus* NO CONTROLE DE *Meloidogyne*
***incognita* E *Meloidogyne javanica* IN VITRO E NA CANA-**
DE-AÇÚCAR

Rivanildo Junior Ferreira

Biólogo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ESPÉCIES DE *Bacillus* NO CONTROLE DE *Meloidogyne
incognita* E *Meloidogyne javanica* IN VITRO E NA CANA-
DE-AÇÚCAR**

Rivanildo Júnior Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares

Coorientador: Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)

2015

F383e Ferreira, Rivanildo Júnior
Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e
Meloidogyne javanica in vitro e na cana-de-açúcar / Rivanildo Júnior
Ferreira. – – Jaboticabal, 2015
xi, 60 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Pedro Luiz Martins Soares

Coorientador: Jaime Maia dos Santos

Banca examinadora: Bruno Flávio Figueiredo Barbosa, Rita de
Cássia Panizzi

Bibliografia

1. *Bacillus amyloliquefaciens*. 2. *Bacillus firmus*. 3. *Bacillus subtilis*.
4. Nematoides de galhas. 5. Rizobactérias promotoras de crescimento
de plantas. 6. *Saccharum* spp. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.13:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESPÉCIES DE *Bacillus* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*
E *Meloidogyne javanica* IN VITRO E NA CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: RIVANILDO JÚNIOR FERREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO LUIZ MARTINS SOARES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JAIME MAIA DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PEDRO LUIZ MARTINS SOARES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. BRUNO FLÁVIO FIGUEIREDO BARBOSA
Agrolatino Biotecnologia S. A. / Jaboticabal/SP



Profa. Dra. RITA DE CASSIA PANIZZI

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 20 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RIVANILDO JUNIOR FERREIRA – Nascido em 04 de dezembro de 1985, na cidade de Chapada do Norte - MG. Ingressou no ano de 2007, na Faculdade de Educação São Luis, Jaboticabal-SP, no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. De 2007 a 2011, foi bolsista pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão – FUNEP, onde estagiou no Laboratório de Nematologia do Departamento Fitossanidade da FCAV/Unesp, em projetos de pesquisa, na área de controle de fitonematoides. Em janeiro de 2010, obteve o título de Biólogo. Trabalha no Laboratório de Nematologia do Departamento Fitossanidade da FCAV/Unesp, vinculado à Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão – FUNEP. No ano de 2012, ingressou como aluno regular no curso de Mestrado em Agronomia no Programa Produção Vegetal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal - SP.

Vá em frente.

A estrada para o sucesso não é reta. Há uma curva chamada fracasso, um trevo chamado confusão, um quebra-molas chamado amigos; faróis de advertência, chamados famílias e pneus furados, chamados empregos. Mas se você tiver um estepe chamado determinação, um motor chamado perseverança, um seguro chamado fé e um motorista chamado **Jesus**, você certamente chegará a um lugar chamado sucesso!

Autor desconhecido

“Na evolução das espécies, não as mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes,
e sim as suscetíveis à mudança”

Charles Darwin

Dedico a toda minha família, principalmente meus pais Ana Gomes Ferreira e José Lemos Ferreira, por ser um estímulo para seguir em frente ao longo desta caminhada, mesmo longe me passando carinho e amor incondicional. Aos meus irmãos pelo incentivo incondicional, apoio e ensinamentos para superação dos obstáculos em todos os momentos. Família amo muito vocês !!!!

HOMENAGEIO...

Deise Marcondes, pela paciência, pela compreensão e companheirismo de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter proporcionado várias conquistas. Pela sabedoria e força nos momentos difíceis para seguir em frente, superando os obstáculos para conclusão desta etapa de minha vida.

Aos meus pais (Ana e José) e aos meus irmãos, pelo apoio constante. Sempre me incentivando durante todo o tempo, com carinho e amor incondicional.

A Deise por estar sempre ao meu lado, me dando apoio.

Aos professores Dr. Pedro Luiz Martins Soares pela orientação e Dr. Jaime Maia dos Santos pela coorientação, atenção, paciência, conhecimentos e ensinamentos diários, contribuindo para a minha formação profissional.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Nematologia, Valmir Ribeiro, Sandra Sesso, André Maurício e Suelen Bernal, pela amizade, pelos conhecimentos adquiridos e pela convivência.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia, Marilene, Kerly, Herick, Vanessa, Élder, Eduardo, Marina e Ilana, pela amizade.

Aos amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Nematologia, Franciele Carneiro, Samira Scaff, Gleina Alves, Camila Kauffmann, Andreza Silva, Alaiane Vedravini, Eduardo Almeida, Luciany Favoreto e Sérgio Calzavara, pela amizade.

Ao amigo Rafael Bernal pela experiência e ensinamentos passados na condução e elaboração deste trabalho.

À Empresa Stoller do Brasil pelos isolados bacterianos fornecidos e utilizados no presente trabalho.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação e defesa: Jaime Maia dos Santos, Rita de Cássia Panizzi, Paulo Roberto Martinelli e Bruno Flávio Figueiredo Barbosa, pelas sugestões e ensinamentos passados.

Ao amigo Wanderley Brasil (Fordinho) do Departamento de Fitossanidade, pelos conhecimentos passados, pela ajuda na condução e nas avaliações para execução deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. José Carlos Barbosa pelo auxílio nas análises estatísticas.

À todos Funcionários e Professores do Departamento de Fitossanidade.

Ao Curso de Pós-Graduação do Programa de Produção Vegetal da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, ao coordenador atual do programa Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva e ex-coordenador Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho, e aos demais que contribuíram pelos esclarecimentos e ajudas.

A todos docentes, funcionários, amigos e colegas que fizeram parte dessa longa jornada, de maneira direta ou indiretamente, dedicaram seu tempo, passando sabedoria e ensinamentos, os quais colaboram para realização deste trabalho, de forma a contribuir para minha formação tanto pessoal quanto profissional, meus eternos agradecimentos !!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
Referências.....	7
CAPÍTULO 2 – AÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> SOBRE <i>Meloidogyne incognita</i> E <i>M. javanica</i> IN VITRO.....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Material e métodos.....	21
Resultados e discussão.....	25
Literatura citada.....	30
CAPÍTULO 3 – ESPÉCIES DE <i>Bacillus</i> NO DESENVOLVIMENTO EM CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADA PELOS NEMATÓIDES DE GALHA.....	38
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos.....	43
Resultados e discussão.....	46
Literatura citada.....	52

ESPÉCIES DE *Bacillus* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E *Meloidogyne javanica* IN VITRO E NA CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO – A cultura de cana-de-açúcar é de grande importância para a economia brasileira. Os fitonematoides são um dos fatores limitantes na maioria dos canaviais causando grandes perdas à cultura. O manejo dos nematoides é feito através de nematicidas químicos que são prejudiciais ao homem, meio ambiente e produtos colhidos, devido sua alta toxicidade. O controle biológico tem sido uma alternativa viável e sustentável para o manejo dos nematoides. O objetivo do presente trabalho foi avaliar espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* *in vitro* e na cana-de-açúcar. Foram instalados experimentos em condições de laboratório com delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos: Cadusafós 200 CS (14 L/ha); *B. subtilis*; *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha), além de uma testemunha (água). Os ensaios em vasos, à céu aberto, tiveram delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos *B. subtilis* (10 L/ha), *B. firmus* (10 L/ha), *B. amyloliquefaciens* (10 L/ha), Carbofurano 350 SC (5 L/ha – tratamento padrão) e uma testemunha, com cinco repetições e duas avaliações (100 e 150 dias após inoculação e aplicação dos tratamentos). No ensaio *in vitro*, *B. firmus* (10 L/ha) é o mais eficiente para diminuir a eclosão de J2 de *M. javanica*, sendo estaticamente semelhante ao produto químico testado. Quanto a motilidade de J2 de *M. javanica*, *B. subtilis* (10 L/ha) e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha), causam a mortalidade do nematoide, porém inferior ao padrão químico testado. Para *M. incognita*, *B. firmus* (10 L/ha) proporciona maior eclosão de J2. Quanto a motilidade de J2 de *M. incognita*, Cadusafós 200 CS (14 L/ha) causou a maior mortalidade. Nos ensaios em vasos, todos os tratamentos aumentam o número de perfilhos, mas não controlam os nematoides.

Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, nematoides de galha, Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e *Saccharum* spp.

***Bacillus* species controlling *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*
in vitro and in sugar cane**

ABSTRACT – The sugar-cane crop is very important to Brazilian economy. Phytonematodes are among the main limiting factors of such culture causing great losses. Chemical nematicides are harmful to humans, environment, harvested products, and are the main method used to manage the populations of these nematodes. Biological control have been a sustainable alternative to manage these nematodes. The aim of the present study was to evaluate *Bacillus* species for control *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in vitro and in sugar cane plants. We set assays in laboratory conditions in a completely random design with the treatments: Cadusafós 200 CS (14 L/ha), *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. amyloliquefaciens* (1 and 10 L/ha) and a control (water). The pot assay, in a semi-field condition, had a completely random design with the treatments: *B. subtilis* (10 L/ha), *B. firmus* (10 L/ha), *B. amyloliquefaciens* (10 L/ha), Carbofurano 350 SC, with five replicates and two evaluation periods (100 and 150 days after inoculation and application of treatments). At laboratory assay *B. firmus* (10 L/ha) was the most efficient in decreasing the *M. javanica* J2 eclosion and were statistically similar to the chemical nematicide tested. For *M. javanica* J2 mobility, *B. subtilis* (10 L/ha) and *B. amyloliquefaciens* (1 and 10 L/ha) cause nematode mortality, but lower than that presented by the chemical. To *M. incognita*, *B. firmus* (10 L/ha) provides higher J2 eclosion. For the *M. incognita* J2 mobility, Cadusafos 200CS (14 L/ha) caused higher mortality. In the pot assay, all treatments increase the number of tillers but do not control the nematodes.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, root-knot nematodes, Plant growth promoting Rhizobacteria and *Saccharum* spp.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), com produção na safra de 2014/15 de aproximadamente 659.099 mil t em 9,098 milhões de hectares (CONAB, 2014). O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, com 4,679 milhões de ha plantados, cuja produção é de 356.254 mil t, destinada à fabricação de açúcar e etanol, revelando-se a maior agroindústria do país (CONAB, 2014).

Vários são os problemas fitossanitários da cultura, entre os quais se destacam os nematoides pelas perdas e diminuição da vida produtiva do canavial (MOURA et al., 2000; (DINARDO-MIRANDA, 2008), principalmente em solos com textura média e arenosa. Na literatura consta que o primeiro relato de nematoide na cultura de cana-de-açúcar foi feito por Treub (1885), onde desenvolveu trabalho na Ilha de Java-Indonésia, descrevendo a espécie como *Heterodera javanica*, posteriormente classificado como *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885; Chitwood, 1949) segundo (DIAS-ARIEIRA et al., 2010). No Brasil o primeiro relato de nematoides na cultura, foi feito por (BRIEGER, 1962), onde relatou *Helicotylenchus* sp. e *Trichodorus* sp. parasitando raízes de cana “Co 290” na região de Ribeirão Preto–SP.

De acordo com (BARBOSA et al., 2013), *Pratylenchus zae* (Graham), *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949, são consideradas espécies-chave de nematoides na cana-de-açúcar no Brasil, porém, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven é encontrada em amostras provenientes de canaviais de várias localidades.

Dentre as espécies que atacam a referida cultura, as espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita* e *M. javanica*), são consideradas as mais limitantes à cultura, sendo encontradas praticamente em todas as regiões cultivadas do Brasil (DIAS-ARIEIRA et al., 2010; BARBOSA, 2012).

O sintoma mais frequente decorrente do parasitismo de espécies de *Meloidogyne* é a presença de galhas nas raízes das plantas, embora não seja um sintoma obrigatório na interação planta-nematoide (RIBEIRO et al., 2002). De fato nas Poaceas, este sintoma não é tão fácil de ser observado como é em outras espécies botânicas de outras famílias. Ainda segundo Ribeiro et al. (2002), nos últimos anos, a frequente ocorrência dos nematoides de galha tornou-se motivo de grande preocupação, no sentido de viabilizar o uso agrícola das áreas infestadas. Isso devido à polifagia desses indivíduos que atacam desde plantas de importância econômica até plantas daninhas, dificultando a viabilização de medidas de controle por parte dos agricultores (SILVA et al., 2001; MANZOTTE et al., 2002).

As espécies de *Meloidogyne*, como todos os nematoides, são parasitos obrigatórios, ou seja, precisam de células vivas para se alimentarem. Os juvenis de segundo estágio penetram as raízes, iniciam a formação do sítio de alimentação e se desenvolvem até chegar ao estágio reprodutivo, quando ocorre a postura de ovos pelas fêmeas (TIHOHOD, 2000). A fêmea adulta apresenta formato de pêra ou esferóide, pescoço alongado e depositam seus ovos em uma massa gelatinosa. Esses nematoides são considerados endoparasitos sedentários.

Os machos e juvenis de segundo estágio são vermiformes e todas as formas possuem estilete, estrutura com a qual perfuram as células nas quais se alimentam (COYNE; NICOL; CLAUDIUS-COLE, 2007). A duração do ciclo é muito influenciada por fatores climáticos ou edáficos, mas de modo geral o ciclo de vida desses nematoides dura de três a quatro semanas, em condições favoráveis. Para as espécies *M. javanica* e *M. incognita* as temperaturas ótimas estão entre 25 a 30°C. Por serem pecilotérmicos, são extremamente dependentes da temperatura e pode ocorrer a redução ou paralisação das atividades vitais, quando estas são inferiores a 5°C ou superiores a 40°C (LORDELLO, 1973; FERRAZ, 2001).

Nas raízes de plantas hospedeiras, os nematoides de galha, injetam secreções esofagianas que induzem a formação de tecido nutridor (células gigantes) em áreas adjacentes e no cilindro vascular, provocando hiperplasia local e hipertrofia de células do parênquima cortical, principalmente nas que se encontram ao redor do

corpo do nematoide. O resultado é que as raízes se tornam engrossadas na região parasitada, podendo atingir diâmetro equivalente ao dobro ou triplo do normal. Essas alterações levam à formação de galhas no sistema radicular (FERRAZ, 2001). Além disto, as plantas podem sofrer alteração no sistema radicular, perda da eficiência de absorção, transporte de água e nutrientes e como sintoma reflexo, aparecimento de folhas cloróticas por toda a planta. Em alguns casos, pode ocorrer a morte das plantas atacadas Tihohod (2000), principalmente quando ocorrem outros fatores bióticos ou abióticos concomitantemente.

Na cultura da cana-de-açúcar, o ataque de nematoides compromete as raízes, tornando-as pobres em radículas e incapazes de absorver água e os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas torbam-se menores, raquíticas, cloróticas, murchas nas horas mais quentes do dia e menos produtivas e em condições de campo, são verificadas reboleiras de plantas menores e cloróticas entre outras de porte e coloração aparentemente normais (DINARDO-MIRANDA, 2008).

Em condições brasileiras, *M. javanica* e *M. incognita*, podem causar perdas de produtividade na cultura da ordem de 20 a 30%, respectivamente. Em variedades muito suscetíveis e densidades populacionais muito altas desses nematoides, a redução de produtividade pode chegar a 50% (DINARDO-MIRANDA, 2008). Em estudo realizado por Barbosa (2012) foi constatado que *M. javanica* causou 66% de perdas na cultura. No nordeste do Brasil a meloidoginose causadas por *M. incognita* raça 1 e *M. javanica*, isoladamente ou associadas, provoca reduções na produtividade agrícola de 45% e perdas totais durante estiagens (MOURA, 1991; MOURA, 1995) especialmente quando atua aditivamente com o raquitismo das soqueiras (REGIS; MOURA, 1989; MOURA, 1996). Segundo Taylor e Sasser (1978) a ocorrência de meloidoginose está sempre associada a regiões mais quentes.

As práticas de manejo visando o controle desses parasitos em áreas infestadas têm sido a rotação de culturas com crotalárias e amendoim, o uso de torta-de-filtro e principalmente a aplicação de nematicidas químicos no plantio e nas soqueiras (DINARDO-MIRANDA, 2008). Vários são os produtos registrados na

cultura para o controle de nematoides (AGROFIT, 2014), todavia, o que foi mais usado nas publicações mais recentes e que ainda pode ser encontrado no mercado é o Carbofurano 350 SC (DINARDO-MIRANDA, 2008; DINARDO-MIRANDA; FRACASSO; 2010).

O controle químico apresenta vários inconvenientes, como o alto custo dos produtos, os resíduos nos produtos colhidos, intoxicação pela exposição aos produtos, contaminações de fontes de água e destruição da microflora do solo (GOMES, 1996; VILLAS BOAS et al., 2002; VAZ et al., 2011).

De acordo com Ferraz et al. (2001), diversas pesquisas vêm sendo realizadas em todo mundo, buscando métodos eficientes e ambientalmente seguros para manejo e com o objetivo de explorar o potencial de inimigos naturais dos nematoides para ser utilizado no controle biológico. O controle biológico tem-se apresentado como uma alternativa ecologicamente sustentável para o manejo de nematoides, por minimizar danos ambientais, quando comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005; VAZ et al., 2011). Além de apresentar inúmeras vantagens em relação ao controle químico, o controle biológico (com fungos, vírus, bactérias e outros) é de fácil aplicação, tendo menor custo, não é danoso ao meio ambiente e ao homem (SOARES; SANTOS, 2006).

Entre os vários inimigos naturais identificados como potenciais agentes de controle biológico, entre as mais estudadas está uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito nematicida (STURZ; NOWAK, 2000; TIAN et al., 2007; MACHADO et al., 2012).

Estas bactérias com características adaptativas para viver na rizosfera, colonizadoras das raízes de plantas, tem potencial para promover o desenvolvimento de plantas e controle biológico de nematoides, são também conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (SCHROTH; HANCOCK 1982; STIRLING, 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999).

Pesquisas visando à aplicação dessas bactérias no controle de nematoides estão voltadas principalmente para componentes da rizosfera com capacidade de

modificar este ambiente, afetando direta ou indiretamente estes parasitas (MACHADO et al., 2012).

O principal modo de ação das RPCPs é a produção de substâncias bactericidas, fungicidas ou micostáticas e nematicidas que inibem o crescimento e o desenvolvimento dos agentes das doenças (LUZ, 1996), de antibióticos, toxinas e enzimas, da interferência no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, da indução de resistência e/ou proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (MANKAU, 1980; STIRLING, 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999; TIAN et al., 2007).

Como exemplos, são algumas espécies de *Bacillus* (NEIPP & BECKER, 1999; CHEN; DICKSON, 2000; TIAN et al., 2007), que apresentam antagonismo direto aos nematoides *in vitro*, além de provocar a redução na frequência de doenças em condições de campo (LIU; SINCLAIR, 1992; KLOEPPER et al., 2004; SHANTI; RAJEDRAN, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2011).

Vários trabalhos relataram a ação nematicida de espécies de *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *B. sphaericus* e *B. licheniformes*) no controle de diferentes espécies de nematoides (CARNEIRO et al., 1998; JONATHAN et al., 2000; KEMPSTER et al., 2001; CHEN; DICKSON, 2004).

Mais de 60 tipos de antibióticos são sintetizados por *B. subtilis*, além de muitos polipeptídios (PHAE; SHODA, 1991). Esta espécie também se caracteriza por produzir endotoxinas que interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides, especialmente na oviposição e eclosão dos juvenis (SHARMA; GOMES, 1996).

Algumas toxinas são secretadas por *B. firmus* que prejudicam especialmente a formação da película externa das posturas de nematoides formadores de galhas, inibindo a eclosão, além de atuarem sobre os juvenis (MACHADO et al., 2012).

Avaliando a ação de 20 isolados de rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e *M. javanica in vitro*, Alves et al. (2011) observaram que nenhum dos isolados avaliados influenciaram na eclosão de *M. incognita*, entretanto para *M. javanica*, os isolados *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* proporcionaram pronunciada ação ovicida.

Estudando o efeito de filtrados de 14 isolados bacterianos endófitos, obtidos de plantas de tomate e pimentão sobre motilidade e mortalidade de juvenis de segundo (J2) estágio de *M. javanica*, Oliveira et al. (2009), constataram que dos 14 isolados, cinco proporcionaram mortalidade de J2 superior a 90%.

Estudos *in vitro* mostraram que um produto comercial à base de *B. firmus* inibiu a eclosão de juvenis de *M. incognita* e reduziu 91% a formação de galhas em raízes de tomateiro (TEREFE et al., 2009).

Foi demonstrado por Araújo et al. (2002) que isolados de *B. subtilis* produzem metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematoides e também podem inibir a eclosão de juvenis e o processo pelo qual eles penetram nas raízes. Também, a produção de proteases e a indução de enzimas de defesa na planta hospedeira são mecanismos atribuídos a *B. subtilis* no controle de nematoides (LIAN et al., 2007; KAVITHA; JONATHAN, 2007).

Estudos sobre o efeito nematicida de *Bacillus* spp. envolvem principalmente sua ação contra os nematoides formadores de galha (*Meloidogyne* spp.) (MACHADO et al., 2012).

A aplicação de *B. subtilis*, em suspensão aquosa promoveu o crescimento de cana-de-açúcar e reduziu a reprodução dos nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) (CARDOZO; ARAÚJO, 2011).

Aplicações de isolados de *B. subtilis* no momento do plantio controlaram os nematoides de forma semelhante ao tratamento químico com Carbofurano para as variáveis analisadas e promoveu maior massa da parte aérea quando comparada a RB72454 e obteve melhor resposta ao tratamento biológico (MAZZUCHELLI; ARAÚJO, 2011).

A inoculação de *B. subtilis* PRBS-1 em plantas de tomateiro aumentaram a biomassa da parte aérea e reduziram a reprodução da população de *Meloidogyne* sp. (ARAÚJO; MARCHESI, 2009). Esta mesma espécie proporcionou 100% de germinação de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e diminuiu o número de galhas formadas por *M. javanica* (DAWAR et al., 2008).

Foi feita a avaliação de isolados de *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* na cultura do feijoeiro em casa de vegetação por Fernandes et al. (2013) e verificaram que nenhum isolado bacteriano incrementou a massa das partes aéreas e das raízes das plantas, não reduziu o número de galhas induzidas pelo nematoide, entretanto, o isolado 51 reduziu os ovos, cerca de quatro vezes em relação a testemunha. Utilizando a combinação entre microbiolização de sementes com *B. subtilis* e a aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) no solo, Fernandes et al. (2014) constataram redução de mais de 80% no número de ovos e J2 de *M. javanica* em tomateiro, em comparação com a adoção de apenas um dos tratamentos isoladamente.

Considerando os dados apresentados, os isolados e as espécies de *Bacillus*, tem grande potencial de serem utilizados como agentes de controle biológico, por interferirem no ciclo de vida, infecção e parasitismo dos nematoides, além de promoverem o desenvolvimento das plantas. Todavia, mais estudos são necessários envolvendo diferentes espécies de nematoides e botânicas.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram:

- Avaliar espécies de *Bacillus* sobre a eclosão e mobilidade de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.
- Espécies de *Bacillus* no controle de nematoides de galha chave e no desenvolvimento da cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 dez. 2012.

ALVES, G. C. S.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; JESUS, F. G.; ALMEIDA, E. J. THULER, R. T. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *MELOIDOGYNE*

incognita, *M. javanica* e *Pratylenchus zeae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.4, p. 557-564, 2011.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.5, p.1558-1561, 2009.

ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.197-202, 2002.

BARBOSA, B. F. F. **Agressividade comparada de *Pratylenchus brachyurus* com *P. zeae* e eficácia de métodos de controle de nematoides em cana-de-açúcar**. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

BARBOSA, B. F. F.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, J. C.; SOARES, P. L. M.; RUAS, A. R.; CARVALHO, R. B. Aggressiveness of *Pratylenchus brachyurus* to sugarcane, compared with key nematode *P. zeae*. **Nematropica**, Gainesville,, v. 43, p. 119-130, 2013.

BRIEGER, F. A. **Recomendação para o plantio da cana-de-açúcar**. São Paulo: Cooperativa Oeste do Estado de São Paulo, 1962. (Boletim Técnico Copersucar, 10).

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 12 p.1283–1288, 2011.

CARNEIRO, R. G.; SOUZA, I.; BELARMINO, L. C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, n.1, p.12-21, 1998.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 32, n.1, p. 117- 121, 2000.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. Biological control of nematodes with bacterial antagonists. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed). **Nematology – Advances and perspectives**. Volume II: nematode management and utilization. Wallingford: CABI Publishing, 2004. Chap. 9, 1041-1062 p.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p.232-238, 2005.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, segundo levantamento, agosto/2014. Brasília : Conab 2014.

COYNE, D. L.; NICOL, J. M.; CLAUDIUS-COLE, B. **Nematologia prática: um guia de campo e de laboratório**. Cotonou: Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), 2007. 82 p.

DAWAR, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M.J. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n.1, p. 439-444. 2008.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; SANTOS, D. A.; SOUTO, E. R.; BIELA, F.; CHIAMOLERA, F. M.; CUNHA, T. P.L.; SANTANA, S. M.; PUERARI, H. H. Reação de variedades de cana-de-açúcar aos nematoides-das-galhas. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 4, p.198-203, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Fitossanidade. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. LANDEL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 405-422.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Efeito da Torta de Mamona sobre Populações de Nematoides Fitoparasitos e a Produtividade da Cana-de-açúcar, **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n.1, p.68-71, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; MENEGATTI, C. C. Controle químico de nematoides em soqueiras de cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 55-58, 2000.

FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S.; BONTEMPO, A. F. Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 7, n.1, p. 76 - 81. 2013.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.1, p.194-200, 2014.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidogynoses da soja: passado, presente e futuro: In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Reações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja**. Londrina:Embrapa, 2001. p. 15-38.

GOMES, J. T. Dispersion and level of root infestation by the "burrowing nematodes *Radopholus similis*" Cobb in some banana plantations of El Oro province, Ecuador. In: ACORBAT Meeting. 12, 1996, Santo Domingo. **Abstract...** Santo Domingos: Junta Agroempresarial Dominicana, 1996. p. 88.

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

KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, Coimbatore, v. 21, n.1, p.211-215, 2007.

KEMPSTER, V. N.; DAVIES, K. A.; SCOTT, E. S. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 35-43, 2001.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p.1259-1266, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>>.

LIAN L. H.; TIAN, B. Y.; XIONG, M. Z.; ZHU, M. Z. XU, J.; ZHANG, K. Q. Proteases from *Bacillus*: A new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 262-269, 2007.

LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. Population dynamics of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 in the rhizosphere of soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 1297-301, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-82-1297>>.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. São Paulo: Livraria Nobel, 1973. 197p.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo v. 4, p. 1-49, 1996.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, Rydalmere, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2012.1602.02>>.

MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 12, n. 4, p. 244-252. 1980. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.002215>>.

MANZOTTE, U.; DIAS, W. P., MENDES, M. DE L.; SILVA, J. F. V. DA; GOMES, J. Reação de híbridos de milho a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26 n.1, p. 105-108, 2002.

MAZZUCHELLI, R. C. L.; ARAÚJO, F. F. Eficácia do controle de nematoides por *Bacillus subtilis* em duas variedades de cana-de-açúcar. **Colloquium Agrarie**, Presidente Prudente, v. 7, n. esp., p. 51-58, 2011.

MOURA, R. M. Dois anos de rotação de culturas em campos de cana-de-açúcar para controle de meloidoginose. 1. Efeito dos tratamentos na população do nematoide. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, V. 15, n.1, p.1-7, 1991.

MOURA, R. M. Dois anos de rotação de culturas em campos de cana-de-açúcar para controle de meloidoginose. 2. Efeito dos tratamentos na produtividade agroindustrial na cana planta. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, V. 20, p. 597-600, 1995.

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: Luz, W. C. (Ed): **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 209-244, 1996.

MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.; MARANHÃO, S. R. V. L.; MACEDO, M. E. A.; MOURA, A. M.; SILVA, E. G.; LIMA, R. F. Ocorrência dos nematoides *Pratylenchus zae* e *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar no Noroeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 101-103, 2000.

NEIPP, P. W. BECKER, J. O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii*. **The Journal of Microbiology**, Reading, v. 31, n. 1, p. 54-61, 1999.

OLIVEIRA, A. S.; CAMPOS, V. P.; SILVA, J. R. C.; OLIVEIRA, M. S. & SOUZA, R. M. Efeito de Bactérias Endofíticas sobre *Meloidogyne javanica* e Métodos de Inoculação em Tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.33, n1, p. 45-53, 2009.

REGIS, E. M. O.; MOURA, R.M. Efeito conjunto da meloidoginose e do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, p. 119-128, 1989.

RIBEIRO, N. R.; SILVA, J. F. V.; MEIRELLES, W. F.; CRAVEIRO, A. G.; PARENTONI, S. N.; SANTOS, F. G. Avaliação da resistência de genótipos de milho, sorgo e milheto a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, v.1, n.3, p.102-103, 2002.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, Washington, v. 216, n. 5453, p. 1376-1381, 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.216.4553.1376>>.

SHANTHI, A.; RAJENDRAN, G. Induction of systemic resistance in banana against lesion nematodes by biocontrol agents. **International Journal of Nematology**, Luton, v. 16, p. 75-78. 2006.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.20, n.1, p.53-62, 1996.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, Washington, v. 69, n. 2, p. 167–179, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00122-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00122-9)>.

SILVA, J. F. V.; DIAS, W. P.; MANZOTE, U.; GOMES, J. **Produção de grãos em ambientes com nematoides de galhas**. Londrina: Embrapa Soja: Fapeagro, 2001. 15 p. (Documentos, 168).

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. Utilização de fungos nematofágos no controle biológico de fitonematóides. In: BORTOLI, S. A.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, J. E. M. **Agentes de controle biológico**: metodologia de criação, multiplicação e uso. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 281-329.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 1991. 282p.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 183-190, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00094-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00094-9)>.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biología, indentificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz**. Proyecto internacional de *Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State University, 1983. 109 p.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 100, n. 2, p. 94-99, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.004>>.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v. 61, n. 2, p. 197-213, 2007.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473 p.

VAZ, M. V.; CANEDO, E. J.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, Patos de Minas, v.1, n. 8, p.203-212, 2011.

VILAS BOAS, L. C.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S. P.; ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 690-693, 2002.

WINCHESTER, J. A. Sugar-cane nematode control. In: PEACHERRY, J. E. (Ed.). **Nematodes of tropical crops**. Heartes: C. A. B, 1969. p. 204-209.

1 **CAPÍTULO 2- AÇÃO DE ESPÉCIES DE *Bacillus* SOBRE A ECLOSÃO E**
2 **MOBILIDADE DE *Meloidogyne incognita* E *M. javanica* IN VITRO**

3
4 Rivanildo Junior Ferreira^{1*}; Pedro Luiz Martins Soares², Rafael Bernal de Carvalho¹,
5 Vanessa dos Santos Paes-Takahashi¹; Jaime Maia dos Santos², Elder Simões de
6 Paula Batista³ e Bruno Flávio Figueiredo Barbosa⁴.

7
8 *Parte da dissertação de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) do autor. E-
9 mail: jferreirafcav.unesp@gmail.com

10 ^{1,3}Aluno de Pós - Graduação em Agronomia (¹Produção Vegetal) e (³Entomologia
11 Agrícola),

12 ²Professor Assistente Doutor e Nematologista – Departamento de Fitossanidade –
13 Unesp (Universidade Estadual Paulista) – FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e
14 Veterinárias), Câmpus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane,
15 s/n. Jaboticabal-SP 14884-900.

16 ⁴Pesquisador da Agrolatino Biotecnologia S/A – Taquaral-Rincão, SP. Estrada
17 Fazenda Recreio, s/n. Caixa postal 49.

18
19 **RESUMO**

20 Ferreira, R. J, P. L. M., Soares, R.B. Carvalho, V.S. Paes-Takahashi, J.M. Santos,
21 E.S.P. Batista, B.F.F. Barbosa. 2015. Ação de espécies de *Bacillus* sobre a eclosão
22 e mobilidade de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* in vitro. Nematropica 41:00-00.

23
24 Os nematoides de galha são limitantes à produtividade e à lonvegidade dos
25 canaviais, comprometendo essa cultura de grande importância para o Brasil.
26 Espécies de *Bacillus* têm apresentado efeito antagônico e poderão ser uma
27 alternativa sustentável de controle de nematoides, em relação aos nematicidas
28 químicos. Assim, objetivou-se avaliar se *Bacillus* tem ação sobre a eclosão e a

1 motilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e *M. javanica* *in vitro*.
2 O experimento foi instalado em condições de laboratório e em delineamento
3 inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições, constituídas por
4 uma câmara de eclosão cada. As avaliações de eclosão foram realizadas a cada 72
5 horas (4 avaliações) e a motilidade de J2 a cada 24 horas (2 avaliações). Os
6 tratamentos foram: Testemunha (água); Cadusafós 200 CS (14 L/ha); *B. subtilis*; *B.*
7 *firmus* e *B. amyloliquefaciens* na concentração 1×10^8 u.f.c. (1 e 10 L/ha). *Bacillus*
8 *firmus* (10 L/ha) é o mais eficiente para diminuir a eclosão de J2 de *M. javanica*,
9 sendo estaticamente semelhante ao produto químico testado. Quanto a motilidade
10 de J2 de *M. javanica*, *B. subtilis* (10 L/ha) e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha),
11 causam a mortalidade do nematoide, porém inferior ao padrão químico testado. Para
12 *M. incognita*, *B. firmus* (10 L/ha) proporciona maior eclosão de J2. Quanto a
13 motilidade de J2 de *M. incognita*, Cadusafós 200 CS (14 L/ha) causou a maior
14 mortalidade.

15

16 Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*,
17 nematoides de galha, Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

18

19

20

21

ABSTRACT

1
2 Ferreira, R. J, P. L. M., Soares, R.B. Carvalho, V.S. Paes-Takahashi, J.M. Santos,
3 E.S.P. Batista, B.F.F. Barbosa. 2015. *Bacillus* species on the eclosion and mobility of
4 *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* *in vitro*. Nematropica 41:00-00.

5
6
7 Root-knot nematodes impair the productivity and longevity of sugar-cane crops,
8 compromising this crop of great importance. *Bacillus* species have been presenting
9 antagonistic effect and can be a sustainable control alternative for gall nematodes.
10 Thus, the aim was to evaluate the action of *Bacillus* on the eclosion and mobility of
11 *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* second stage juveniles (J2) *in vitro*. The
12 assay was set in laboratory conditions in a completely randomized design with eight
13 treatments and five replicates, each constituted by one eclosion chamber. The
14 eclosion evaluations were carried each 72 h in four evaluations and the mobility was
15 evaluated each 24 h in two evaluations. The treatments were: Control (water),
16 Cadusafós 200 CS (14 L/ha), *B. subtilis*, *B. firmus* and *B. amyloliquefaciens* (1 x
17 10⁸c.f.u., 1 and 10 L/ha). *Bacillus firmus* (10 L/ha) was the most efficient in
18 decreasing *M. javanica* J2 eclosion and were statistically similar to the chemical
19 nematicide tested. For *M. javanica* J2 mobility, *B. subtilis* (10 L/ha) and *B.*
20 *amyloliquefaciens* (1 and 10 L/ha) cause nematode mortality, but lower than that
21 presented by the chemical. To *M. incognita*, *B. firmus* (10 L/ha) provides higher J2
22 eclosion. For the *M. incognita* J2 mobility, Cadusafos 200CS (14 L/ha) caused higher

1 mortality. In the pot assay, all treatments increase the number of tillers but do not
2 control the nematodes.

3

4 Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus subtilis*, root-knot
5 nematodes plant growth promoting rhizobacteria.

6

7

8

INTRODUÇÃO

9

10 A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem grande importância para
11 a economia nacional, uma vez que a sua matéria prima é utilizada pela indústria
12 para a produção principalmente de açúcar e o etanol (Benett *et al.*, 2011).

13 Os nematoides de galha *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919)
14 Chitwood 1949 e *M. javanica* (Treub, 1885; Chitwood, 1949) são fatores limitantes à
15 cultura em muitas regiões produtoras, principalmente em áreas com textura média e
16 arenosa, causando 20 a 40% de perdas na produtividade no primeiro corte,
17 reduzindo também a produtividade das soqueiras e a longevidade do canavial
18 (Dinardo-Miranda, 2008).

19 O principal método de controle de nematoides utilizado na cultura de cana-de-
20 açúcar, por ser uma cultura semi-perene, é o uso de nematicidas químicos que
21 apresentam elevado custo, além de causar grande impacto ambiental, acumulando
22 substâncias tóxicas no solo e na água. Podem deixar resíduos nos produtos
23 colhidos, intoxicar humanos e animais, contaminar fontes de água, destruir a

1 microflora do solo (Villas Boas *et al.*, 2002) e, em longo prazo, podem favorecer a
2 seleção de biótipos de nematoides resistentes (Stolf, 2015). O controle de
3 nematoides é mais difícil quando comparado a outras pragas agrícolas, uma vez que
4 a maioria deles habita inicialmente o solo e atacam as partes subterrâneas das
5 plantas (Stirling, 1991).

6 Como alternativa viável, de fácil aplicação, menor custo do que o químico e
7 com o objetivo de diminuir as perdas, o controle biológico tem se destacado no
8 controle de nematoides (Coimbra e Campos, 2005; Berry *et al.*, 2009).

9 Como potenciais agentes de controle biológico de nematoides, entre os mais
10 estudados está uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito nematicida
11 (Sturz e Nowak, 2000; Tian *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012). Essas bactérias,
12 conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) e
13 caracterizadas por viverem na rizosfera, colonizando as raízes das plantas, tendo
14 potencial na promoção no desenvolvimento das plantas e no controle biológico de
15 nematoides (Schroth e Hancock, 1982; Stirling, 1991; Siddiqui e Mahmood, 1999;
16 Vaz *et al.*, 2011).

17 As rizobactérias podem atuar diretamente sobre os nematoides por meio de
18 antibióticos e toxinas que inibem a eclosão e a motilidade dos juvenis, reduzindo a
19 invasão dos nematoides nas raízes das plantas. Além disso, podem modificar os
20 exsudados radiculares, fazendo com que os mesmos não sejam reconhecidos pelos
21 nematoides e, conseqüentemente inibindo a infecção de raízes (Ramamoorthy *et al.*,
22 2001; Higaki e Araújo, 2012).

1 Vários trabalhos relataram a ação nematicida de espécies de *Bacillus* no
2 controle de diferentes espécies de nematoides (Carneiro *et al.*, 1998; Jonathan *et al.*,
3 2000; Kempster *et al.*, 2001; Chen e Dickson, 2004). Essas bactérias apresentam
4 antagonismo direto aos nematoides, além de provocar a redução na frequência de
5 doenças em condições de campo (Liu e Sinclair, 1992; Kloepper *et al.*, 2004; Shanti
6 e Rajedran, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011).

7 Muitos polipeptídios e dezenas de tipos de antibióticos são sintetizados por *B.*
8 *subtilis*, (Phae e Shoda, 1991). Essa mesma espécie de *Bacillus* se caracteriza por
9 produzir endotoxinas que interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides,
10 especialmente na oviposição e eclosão dos juvenis (Sharma e Gomes, 1996).

11 Algumas toxinas são secretadas por *B. firmus* que prejudicam especialmente
12 a formação da película externa das posturas de nematoides formadores de galhas,
13 inibindo a eclosão, além de atuarem sobre os juvenis (Machado *et al.*, 2012).

14 De fato Alves *et al.* (2011) ao avaliarem a ação de 20 isolados de
15 rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de
16 *M. incognita* e *M. javanica in vitro*, constataram que nenhum dos isolados avaliados
17 influenciaram a eclosão de *M. incognita*, entretanto para *M. javanica*, os isolados
18 *Alcaligenes faecalis* e *Bacillus* spp. proporcionaram pronunciada ação ovicida. Entre
19 os isolados testados sobre a motilidade dos nematoides apenas *B.*
20 *amyloliquefaciens* e *B. subtilis* evidenciaram potencial como agente do controle de
21 juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. Oliveira *et al.* (2009) constataram que
22 filtrados de cinco de 14 isolados bacterianos endofíticos, proporcionaram
23 mortalidade de J2 superior a 90%.

1 Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a ação nematicida de
2 espécies de *Bacillus* sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio
3 de *M. incognita* e *M. javanica* *in vitro*.

4

5

6

MATERIAL E MÉTODOS

7

8 O experimento foi realizado no Laboratório de Nematologia do Departamento
9 de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal.

10 A subpopulação de *M. javanica* foi recuperada de raízes de quiabeiro
11 (*Hibiscus esculentus* L.) infectadas, na região de Piacatu (SP) e a subpopulação de
12 *M. incognita* raça 3, recuperada de uma lavoura de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*
13 L.) na região geoeconômica de Barreiras-BA.

14 As referidas espécies foram previamente identificadas com base nos
15 caracteres morfológicos do padrão perineal, preparado conforme Taylor e Netscher
16 (1974), na morfologia da região labial dos machos (Eisenback *et al.*, 1981) e no
17 fenótipo isoenzimático para alfa esterase, obtido pela técnica de Esbenshade e
18 Triantaphyllou (1990).

19 Ambas as populações foram mantidas em tomateiros (*Solanum lycopersicom*
20 L.) 'Santa Cruz Kada', com 30 dias, obtida em substrato orgânico Plantmax[®] em
21 bandejas de poliestireno expandido individualmente e transplantadas em vasos de
22 argila, preenchido com substrato autoclavado, composto de duas partes de areia
23 grossa e uma parte de terra (2:1), mantidos em casa de vegetação.

1 Com as raízes de tomateiro infectadas, preparou-se uma suspensão contendo
2 1.000 ovos e juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide/mL e foram inoculados
3 10 mL em cada uma das mudas de berinjela (*Solanum melongena* L.) 'Comprida
4 Roxa' (Topseed ®) com 22 dias, obtidas em substrato orgânico Plantmax® em
5 bandejas de poliestireno expandido, transplantadas individualmente em vaso
6 contendo substrato autoclavado, mantidos em casa de vegetação, para multiplicação
7 das subpopulações.

8 Cerca de 90 dias após a inoculação, a partir das raízes de plantas de berinjela
9 infectadas, preparou-se uma suspensão do nematoide, segundo Hussey e Barker
10 (1973) e Coolen e D'Herde (1972).

11 A seguir, foi estimado o número de ovos e eventuais juvenis de segundo
12 estágio, com auxílio de uma câmara de contagem de Peters (Southey, 1970), em um
13 microscópio fotônico e a suspensão de cada uma das espécies, foi ajustada para
14 500 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) / mL e 10 mL foram
15 adicionados à cada câmara de eclosão, correspondendo a 5000 ovos e eventuais
16 J2, preparada com placa de Petri de 90 mm de diâmetros, segundo Cliff e
17 Hirschmann (1985).

18 Foram efetuadas avaliações dos diferentes tratamentos sobre eclosão (ação
19 ovicida) e motilidade dos J2 (ação juvenicida). Às câmaras de eclosão foram
20 adicionados, individualmente, 10 mL de suspensão de *M. incognita* e *M. javanica*,
21 contendo 5000 ovos de cada nematoide e 10 mL de suspensão aquosa bacteriana
22 de cada tratamento previamente preparada em concentração dupla, em volume de

1 1/2 litro, armazenada em vidro escuro. Em seguida, foram feitos movimentos
2 circulares de forma a promover a homogeneização da suspensão.

3 Os tratamentos avaliados foram: Testemunha (água); Cadusafós 200 CS (14
4 L/ha); *B. subtilis*; *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* na concentração 1×10^8 u.f.c. (1 e
5 10 L/ha). Para a preparação da solução ou suspensão dos produtos foi considerado
6 um volume de calda de 40 L/ha.

7 Foram utilizadas cinco repetições, sendo cada uma delas constituída por uma
8 câmara de eclosão. Essas câmaras foram mantidas por 12 dias no escuro, em
9 B.O.D. a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Em intervalos regulares de 72 horas, as suspensões de juvenis
10 de *M. incognita* e *M. javanica* das câmaras de eclosão foram recuperadas em um
11 béquer, lavadas em água corrente em uma peneira de 500 mesh e recolhidos em
12 suspensão aquosa, repetindo-se essas operações por quatro avaliações (3, 6, 9 e
13 12) dias.

14 A seguir, foram feitas as estimativas de número de J2 que eclodiram, segundo
15 (Southey, 1970). A avaliação dos juvenis móveis e imóveis, foi realizada conforme a
16 metodologia descrita por Chen e Dickson (2000) que, fundamentalmente, consiste
17 em adicionar uma solução de NaOH 1 N à suspensão de nematoides.

18 A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se móveis “vivos” os
19 nematoides retorcidos/em movimento e imóveis “mortos” os retos/parados. Um
20 volume da solução de cada produto, equivalente à suspensão de juvenis recolhida
21 de cada câmara foi repostado a cada uma das avaliações, de acordo com os
22 tratamentos. A eclosão em água foi considerada o tratamento Testemunha e o
23 Cadusafós 200 CS (14 L/ha) o tratamento padrão de controle.

1 O restante da suspensão foi incubado em câmaras de eclosão, por
2 aproximadamente cinco dias, conforme descrita por (Cliff e Hirschmann, 1985). A
3 seguir, a suspensão foi colocada em um funil de Baermann (Southey, 1970) para
4 obtenção de suspensão aquosa, contendo J2 móveis. A concentração foi ajustada
5 para 500 juvenis/mL e 10 mL dessa suspensão foram aplicados por câmara de
6 eclosão, para avaliação do efeito de contato dos produtos utilizados (avaliação da
7 mortalidade).

8 A seguir, foram adicionados 10 mL da solução ou suspensão aquosa de cada
9 produto em cada câmara, conforme descrito anteriormente. Foram utilizadas cinco
10 repetições, sendo cada uma delas constituída por uma câmara de eclosão. As
11 câmaras foram mantidas por dois dias no escuro, em B.O.D. a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram
12 feitas duas avaliações em intervalos de 24 horas, dos juvenis das câmaras de
13 eclosão onde foram recuperados em um béquer, lavados em água corrente em
14 peneira de 500 mesh e recolhidos em suspensão aquosa. Em seguida, foram feitas
15 as estimativas dos números de J2 móveis “vivos” e imóveis “mortos”, segundo
16 Southey (1970).

17 A avaliação dos juvenis móveis e imóveis foi realizada conforme a
18 metodologia descrita anteriormente. Um volume da solução ou suspensão de cada
19 produto, equivalente à suspensão de juvenis recolhida de cada câmara foi repostado a
20 cada uma delas, de acordo com os tratamentos.

21 Para a avaliação da ação ovicida e juvenicida dos tratamentos, os dados
22 obtidos foram somados em todas as avaliações realizadas, para verificar o total de
23 juvenis de segundo estágio recuperados. Também, determinou-se do que foi

1 recuperado dos J2 o percentual dos que estavam móveis “vivos” e imóveis “mortos”,
2 através da fórmula $(N^\circ \text{ de formas imóveis} / (N^\circ \text{ de formas móveis} + N^\circ \text{ de formas}$
3 $\text{imóveis})) \times 100$.

4 Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância pelo teste F,
5 comparando-se as médias pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. As análises
6 foram realizadas no software Agroestat (Barbosa e Maldonado, 2011).

7

8

9

RESULTADOS E DISCUSSÃO

10

11 A média total de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* recuperados
12 nas quatro avaliações (após 12 dias) para Cadusafós 200 CS (14 L/ha) foi a menor
13 em relação aos demais tratamentos, representando 98% de redução na eclosão de
14 J2 e mortalidade dos ovos em relação à Testemunha (água), representando quase
15 100% de ação ovicida deste produto. Os tratamentos com *B. subtilis* (1 e 10 L/ha) e
16 *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha), também, apresentaram ação ovicida sobre *M.*
17 *incognita* com 58; 58; 75 e 73% de redução na eclosão dos ovos em relação a
18 Testemunha (água), respectivamente, apesar de ter sido inferior a Cadusafós 200
19 CS (14 L/ha). O tratamento com *B. firmus* (10 L/ha) apresentou a maior média de
20 eclosão de *M. incognita*, representando aumento de 99% de eclosão em relação a
21 Testemunha (água) (Tabela 1). Também, Terefe *et al.* (2009) verificaram que *B.*
22 *firmus* inibiu a eclosão de J2 de *M. incognita*. Esses resultados diferem dos obtidos
23 por Alves *et al.* (2011), quando avaliaram *in vitro* a ação de 20 isolados de

1 rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade de J2 de *M. incognita* e *M. javanica*. Os
2 autores constataram que os isolados avaliados não proporcionaram ação ovicida
3 sobre *M. incognita*. Araújo *et al.* (2002) verificaram que *B. subtilis* reduziu a eclosão
4 de J2 de *H. glycines* quando estimulados com exsudatos de sementes de soja.
5 Esses mesmos autores, concluíram que isolados de *B. subtilis* produzem metabólitos
6 tóxicos que prejudicam o desenvolvimento dos nematoides e também inibem a
7 eclosão de juvenis e o processo pelo qual eles penetram nas raízes.

8 Para o total de J2 de *M. javanica* recuperados, os tratamentos com Cadusafós
9 200 CS (14 L/ha) e *B. firmus* (10 L/ha) apresentaram respectivamente 90 e 86% de
10 redução na eclosão dos ovos de *M. javanica* em relação a Testemunha (água). Para
11 o total de J2 de *M. javanica* recuperados no tratamento com Cadusafós 200 CS (14
12 L/ha) 86% estavam mortos, enquanto que para *B. firmus* (10 L/ha) apenas 2%
13 estavam mortos e os demais tratamentos foram ainda menos eficientes e
14 semelhantes a Testemunha (água), exceto para *B. subtilis* (1 L/ha) que 19%
15 estavam mortos, evidenciando a maior ação juvenicida do Cadusafós (Tabela 1).
16 Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira *et al.* (2008), estudando o efeito
17 de produto biológico à base de *Bacillus* sp., *in vitro*, sobre *M. incognita* e *M. javanica*.
18 Esses autores observaram variação na ação de um produto biológico comparado a
19 um nematicida sobre a eclosão de *M. incognita* e *M. javanica*. Com efeito, eles
20 observaram que o produto biológico teve efeito sobre a eclosão de *M. incognita*,
21 porém eficácia inferior ao Aldicarbe150G (15 kg/ha). Para *M. javanica*, no que diz
22 respeito à eclosão, somente o produto Aldicarbe apresentou efeito. Alves *et al.*

1 (2011) também constataram que os isolados bacterianos *Pseudomonas*
2 *plecoglossicida* e *Alcaligenes faecalis* proporcionaram ação ovicida para *M. javanica*.

3 Dezenas de tipos de antibióticos são sintetizados por *B. subtilis*, além de
4 muitos polipeptídios (Phae e Shoda, 1991). Também, as endotoxinas produzidas por
5 *B. subtilis* interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides, na oviposição e na
6 eclosão dos juvenis (Sharma e Gomes, 1996). Produtos à base de *Bacillus* spp.
7 interferem no ciclo de vida de nematoides, podendo ser utilizados na prática de
8 controle biológico desses patógenos (Machado *et al.*, 2012). Esses pesquisadores
9 relatam que *B. firmus* secretam toxinas, prejudicando formação da película externa
10 das posturas de nematoides formadores de galha, inibindo a eclosão. Segundo
11 alguns autores (Spiegel *et al.*, 1990; Alves *et al.*, 2011), algumas rizobactérias
12 promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) são produtoras de enzimas líticas,
13 como quitinases e proteases que degradam as paredes de ovos de espécies de
14 *Meloidogyne*, enquanto outras atrasam a eclosão de J2, causando a mortalidade de
15 formas infectantes dos nematoides ou interferem no processo de reconhecimento da
16 planta hospedeira.

17 Para o número total de J2 de *M. incognita* recuperados, após 48 h, o
18 tratamento com Cadusafós 200 CS (14 L/ha) apresentou a menor média em relação
19 aos demais tratamentos, representando 87% de mortalidade de J2 de *M. incognita*
20 em relação a Testemunha (água). Dos 13% dos juvenis recuperados para este
21 tratamento, 90% mortos, enquanto que para os demais tratamentos abaixo de 37%
22 estavam mortos, semelhantes a Testemunha (água), evidenciando a maior eficiência
23 e ação juvenicida do Cadusafós (Tabela 2).

1 Ashoub e Amara (2010), constataram que *B. thuringiensis*, *P. fluorescens* e
2 *Rhizobium leguminosarum* causaram a mortalidade de 100% de juvenis de *M.*
3 *incognita* em 72 horas. Para o total de J2 de *M. javanica* recuperados (Tabela 2),
4 Cadusafós 200 CS (14 L/ha), foi o tratamento que apresentou a menor média em
5 relação aos demais tratamentos, representando 88% de mortalidade dos juvenis em
6 relação à Testemunha (água), apresentando a sua eficiente ação juvenicida. Os
7 tratamentos com *B. subtilis* (10 L/ha) e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha), também
8 apresentaram ação juvenicida com 63; 56 e 68% de mortalidade dos juvenis em
9 relação a Testemunha (água), embora tenha sido inferior ao Cadusafós (Tabela 2).
10 Dos 12% dos juvenis recuperados para este tratamento, 60% estavam mortos,
11 enquanto que para os demais tratamentos, acima de 97% estavam vivos,
12 semelhantes a Testemunha (água), evidenciando a maior eficiência e ação
13 juvenicida do Cadusafós (Tabela 2). Contrariando esses resultados, Oliveira et al.
14 (2009), constataram mortalidade de J2 de *M. javanica* superior a 90%, com cinco de
15 14 isolados bacterianos endofíticos testados. Resultados semelhantes foram
16 encontrados por Naves et al. (2004) avaliando o efeito de sete isolados bacterianos
17 sobre *M. javanica* obtiveram a imobilização de J2 em 24 horas com sete isolados
18 testados. A percentagem de mortalidade foi semelhante ao nematicida aldicarbe
19 utilizado como controle e dois isolados causaram a morte de mais de 90% dos
20 juvenis após 48 h de exposição. Alves et al. (2011) também constataram que *B.*
21 *amyloliquefaciens* e *B. subtilis* evidenciaram potencial como agente do controle de
22 juvenis de segundo estágio de *M. javanica*. Oliveira et al. (2009), constataram que
23 cinco isolados a saber, *Acinetobacter johnsonii* (Tom 1), *Bacillus pumilus* (Pim 12),

1 *A. johnsonii* (Tom 10), *A. johnsonii* (Tom 9) e Tom 2 de 14 isolados de filtrados
2 bacterianos endofíticos, proporcionaram mortalidade de J2 superior a 90%. Foi
3 relatado por Machado *et al.* (2012) que *B. firmus* secretam toxinas, que interferem
4 sobre as formas juvenis. Coimbra e Campos (2005), por sua vez, estudaram o efeito
5 de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão,
6 motilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica* e observaram redução na motilidade e
7 100% de mortalidade de J2 do nematoide. Segundo alguns autores (Spiegel *et al.*,
8 1990; Alves *et al.*, 2011), algumas rizobactérias promotoras do crescimento de
9 plantas (RPCPs) são produtoras de enzimas que causam a mortalidade de formas
10 infectantes dos nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) ou interferem no processo
11 de reconhecimento da planta hospedeira.

12 Dessa forma, pode-se concluir que o tratamento Cadusafós 200 CS (14 L/ha)
13 é o que mais diminui a eclosão de J2 de *M. incognita* portanto, apresenta a maior
14 ação ovicida. Os *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha) também
15 diminuí a eclosão, entretanto, a ação ovicida é inferior ao Cadusafós, enquanto que
16 *B. firmus* (10 L/ha) apresenta a maior eclosão. *Bacillus firmus* (10 L/ha) foi o mais
17 eficiente para diminuir a eclosão de J2 de *M. javanica*, sendo estaticamente
18 semelhante ao produto químico testado e quanto a motilidade de J2 de *M. javanica*,
19 *B. subtilis* (10 L/ha) e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha), causaram a mortalidade do
20 nematoide, porém inferior ao padrão químico testado. Para *M. incognita*, *B. firmus*
21 (10 L/ha) proporciona maior eclosão de J2 e quanto a motilidade de J2 de *M.*
22 *incognita*, *B. subtilis* (10 L/ha) e *B. amyloliquefaciens* (1 e 10 L/ha) causam maior
23 mortalidade de *M. javanica*, porém inferior ao químico testado.

LITERATURA CITADA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

Alves, G. C. S., J. M. Santos, P. L. M. Soares, F. G. Jesus, E. J. Almeida, and R. T. Thuler. 2011. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. Revista Arquivos do Instituto Biológico 78 : 557-564.

Araújo, F. F., and G. V. P. Marchesi. 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. Ciência Rural 39:1558-1561.

Araújo, F. F., J. F. Veloso-Silva, and A. S. Araújo. F. 2002. Influência de *B. subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. Ciência Rural 32: 197-202.

Ashoub, A. H, and M. T. Amara. 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. The Journal of American Science 6 : 321-328.

Barbosa, J.C. and W. Maldonado Jr. 2011. Agroestat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos, Versão 1.1.0.696, Jaboticabal.

Benett, C. G. S., S. Buzetti, K. S. Silva, M. C. M. Teixeira Filho, C. M. P.Garcia, and P. R. Maestrello. 2011. Produtividade e desenvolvimento da cana planta e soca em função de doses e fontes de manganês. Revista Brasileira de Ciência do Solo 35 : 1661-1668.

- 1 Berry, S. D., V. W. Spaul and P. Cadet. 2009. Field assessment of biologically-
2 based control products against nematodes on sugarcane in South Africa. *African*
3 *Plant Protection* .15 : 1–12.
- 4 Carneiro, R. G., I. Souza, and L. C. Belarmino. 1998. Nematicidal activity of *Bacillus*
5 spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 22 : 12-21.
- 6 Chen, S. Y. and D. W. Dickson. 2000. A technique for determining live second-stage
7 juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32:117-121.
- 8 Chen, Z. X., and D. W. Dickson. 2004. Biological control of nematodes with bacterial
9 antagonists. P. 1041-1062. *In*: Z. X. Chen, S. Y. Chen, D. W. Dickson, (Ed.).
10 *Nematology – advances and perspectives. Volume II: nematode management and*
11 *utilization. Beijing: Tsinghua University Press.*
- 12 Cliff, G. M. and H. H Hirschmann.1985.Evaluation of morphological variability in
13 *Meloidogyne arenaria*. *JournalofNematology*17:445-449.
- 14 Coimbra, J. L., and V. P Campos. 2005. Efeito de exsudatos de colônias e de
15 filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis
16 do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 30 : 232-238.
- 17 Coolen, W. A. and C. J. A D´Herde. 1972. Method for the quantitative extraction of
18 nematodes from plant tissue. Ghent: nematology and entomology research station.
19 77.
- 20 Dinardo-Miranda, L.L. 2008. Fitossanidade. Pp. 405-422. in L.L. Dinardo-Miranda, A.
21 C. M. Vasconcelos, M. G. A. Landel, 1 ed. *Cana-de- açúcar. Campinas, SP: Instituto*
22 *Agronômico SP.*

- 1 Eisenback, J.D., H. Hirschmann, J. N Sasser, and A. C. Triantaphyllou. 1981. A
2 guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne*
3 species) with a pictorial key. Pp. 48. Raleigh: The Departments of Plant Pathology
4 and Genetics of North Carolina State University and United States Agency for
5 International Development.
- 6 Esbenshade, P. R. and A. C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the
7 identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22:10-15.
- 8 Ferreira, T. H.; R. O. França, A. Figueiredo, M. A. Santos. Avaliação, *in vitro*, do
9 efeito de produto biológico à base de *Bacillus* sobre os fitonematoides *Meloidogyne*
10 *incognita*, *M. javanica* e *Rotylenchulus reniformis*. 2008. In: 41: Congresso Brasileiro
11 de Fitopatologia Belo Horizonte... Suplemento 33. P. 254.
- 12 Higaki, W. A. and F. F Araujo. 2012. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de
13 nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente
14 infestados. *Nematropica* 42: 295-303.
- 15 Hussey, R. S. and K. R. Barker. 1973. A Comparison of methods of collecting inocula
16 of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-
17 1028.
- 18 Jonathan, E. I.; K. R. Barker, F. F. Abdel-Alim, T. C. Vrain, and D. W. Dickson. 2000.
19 Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria,
20 actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica* 30 : 231-240.
- 21 Kempster, V. N.; K. A. Davies, and E. S. Scott. 2001. Chemical and biological
22 induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover
23 (*Trifolium repens*). *Nematology* 3 : 35-43.

- 1 Kloepper, J. W.; C. M. Ryu, and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and
2 promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94 : 1259-1266.
- 3 Liu, Z. L., and J. B. Sinclair. 1992. Population dynamics of *Bacillus megaterium*
4 strain B153-2-2 in the rhizosphere of soybean. *Phytopathology* 82 : 1297-1301.
- 5 Machado, V.; D. L. Berlitz, A. T. S. Matsumura, R. C. M. Santin, A. Guimarães, M. E.
6 Silva, and L. M. Fiuza. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de
7 fitonematóides. *Oecologia Australis*. 16 : 165 -182.
- 8 Naves, R. L.; V. P. Campos, and, R. M. Souza. 2004. Filtrados de culturas
9 bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo
10 estágio de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*. 29 : 384-388.
- 11 Oliveira, A. S.; V. P. Campos, J. R. C. Silva, M. S. Oliveira, and R. M. Souza. 2009.
12 Efeito de bactérias endofíticas sobre *Meloidogyne javanica* e métodos de inoculação
13 em tomateiro. *Nematologia Brasileira*. 33 : 45-53.
- 14 Phae, C., and M. Shoda. 1991. Investigation of optimal conditions for foam
15 separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of*
16 *Fermentation and Bioengineering* 71 : 118-121.
- 17 Ramamoorthy, V.; T. Viswanathan, V. Raguchander, V. Prakasam, and R.
18 Semiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting
19 rhizobacteria in crop plants pest and diseases. *Crop Protection* 20:1-11.
- 20 Schroth, M. N. and J. G. Hancock, 1982. Disease suppressive soil and root colonizing
21 bacteria. *Science* 216 : 1376-1381.

- 1 Shanthi, A., and G. Rajendran. 2006. Induction of systemic resistance in banana
2 against lesion nematodes by biocontrol agents. *International Journal for Nematology*
3 16 : 75-78.
- 4 Sharma, R. D. and A. C. Gomes. 1999. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria*
5 com *Pausteria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 23 : 47-52.
- 6 Siddiqui, Z. A. and I. Mahmood. 1999. Role of bacteria in the management of plant
7 parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69: 167-179.
- 8 Southey, J. F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes.
9 London: Minist. Agric. Fisch. Fd. Technical Bulletin No. 2. 148 p.
- 10 Spiegel, Y., E. Cohn, S. Galper, D. Lapid, E. Sharon, and I. Chet. Evaluation of
11 chitinolytic microorganisms for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne*
12 *javanica*. 1990. In: *International Nematology Congress*, 2. Veldhoven, Canadá.
13 Abstracts...
- 14 Stirling, G.R. 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress,*
15 *Problems and Prospects.* CAB International, Wallington, UK. 282p.
- 16 Stolf, E. C. 2006. Efeito de fungos endofíticos sobre o desenvolvimento de
17 nematoides da bananeira (*Musa* spp.). Florianópolis, Disponível em:
18 <<http://www.cca.ufsc.br/Projetos/Elaine%20Cristina%20Stolf%202005>>. Acesso em:
19 20 jan. 2015
- 20 Sturz, A.V. and Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the
21 strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil*
22 *Ecology* 15: 183-190.

- 1 Taylor, A. L. and C. Netscher.1974. An improved technique for preparing perineal
2 patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20:268-269.
- 3 Terefe, M., T.Tefera, and P. K. Sakhuja. 2008. Effect of a formulation of *Bacillus*
4 *firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of
5 tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology* 100 :
6 94-99.
- 7 Tian, B.Y.; J.K. Yang, L. H. Lian, C. Y. Wang, and, K. Q. Zhang. 2007. Role of neutral
8 protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. *Applied*
9 *Microbiology and Biotechnology*, 74: 372-380.
- 10 Vaz, M. V., E. J. Canedo, J. C. Machado, B. S. Vieira, and E. A. Lopes. 2011.
11 Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus*
12 *subtilis*. *Perquirere* 8 : 203 – 212.
- 13 Vilas Boas, L. C., R. C. V. Tenente, V. Gonzaga, S. P. SILVA NETO, and H. S.
14 Rocha. 2002. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide
15 *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. *Revista*
16 *Brasileira de Fruticultura* 24 : 690-693.

Tabela 1. Comparações entre as médias de variáveis obtidas em estudo para avaliação de doses de *Bacillus* spp. sobre a eclosão e motilidade de *Meloiodogyne incognita* e *M. javanica in vitro*, até 12 dias.

Tratamento	<i>Meloiodogyne incognita</i>				<i>Meloiodogyne javanica</i>				
	Total de J2 ¹	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²	Total de J2 ¹	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²	Total de J2 ¹	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²
1. Testemunha (água)	457,6 ab	98,2	1,8	2.868,8 a	98,0 a	2,0 c			
2. Cadusafós 200 CS (14 L/ha)	8,8 e	100,0	0,0	272,8 b	13,9 c	86,1 a			
3. <i>B. subtilis</i> (1 L/ha)	189,2 cd	100,0	0,0	1.069,2 a	80,7 b	19,3 b			
4. <i>B. subtilis</i> (10 L/ha)	189,2 cd	100,0	0,0	1.302,4 a	95,2 ab	4,8 bc			
5. <i>B. firmus</i> (1 L/ha)	255,2 bc	89,1	10,9	1.108,8 a	95,8 ab	4,2 bc			
6. <i>B. firmus</i> (10 L/ha)	910,8 a	95,2	4,8	374,0 b	97,9 a	2,1 c			
7. <i>B. amyloliquefaciens</i> (1 L/ha)	114,4 d	98,2	1,8	1.469,6 a	98,5 a	1,5 c			
8. <i>B. amyloliquefaciens</i> (10 L/ha)	123,2 cd	76,7	23,3	950,4 a	99,6 a	0,4 c			
Teste F	21,0**	1,0 ^{ns}	1,0 ^{ns}	8,1**	25,5**	25,5**			
CV%	13,0	20,5	237,2	8,8	13,7	61,8			

3 Para a análise estatística os dados foram transformados em ¹Log (x+5), ²arcsen $\sqrt{x/100}$ para as análises estatísticas. Médias seguidas de
4 mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. **significativo a 1% de
5 probabilidade, ^{ns}não significativo a 5% de probabilidade. Nos tratamentos realizados com as espécies de *Bacillus* foram utilizados 10 L/ha
6 diluídos em água com volume de calda de 150 L/ha na concentração de 1 x 10⁸ U.F.C./mL. O tratamento Carborfurano² 350 SC foi realizado na
7 dose de 5 L p.c/ha.

Tabela 2. Comparações entre as médias de variáveis obtidas em estudo para avaliação de doses de *Bacillus* spp. sobre a motilidade de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* in vitro, até 48h.

Tratamento	<i>Meloidogyne incognita</i>					<i>Meloidogyne javanica</i>		
	Total de J2 ¹	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²	Total de j2 ¹	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²	% de J2 vivos ²	% de J2 mortos ²
1. Testemunha (água)	2.538,8 a	63,2 c	36,8 b	4.373,6 a	100,0 a	0,0 c	100,0 a	0,0 c
2. Cadusafós 200 CS (14 L/ha)	325,6 b	10,0 d	90,0 a	497,2 c	40,3 b	59,7 a	40,3 b	59,7 a
3. <i>B. subtilis</i> (1 L/ha)	1.540,0 a	90,7 abc	9,3 bcd	2.336,4 ab	98,8 a	1,2 bc	98,8 a	1,2 bc
4. <i>B. subtilis</i> (10 L/ha)	1.936,0 a	93,6 a	6,4 d	1.601,6 b	97,1 a	2,9 b	97,1 a	2,9 b
5. <i>B. firmus</i> (1 L/ha)	1.328,8 a	91,0 abc	9,0 bcd	2.120,8 ab	98,9 a	1,1 c	98,9 a	1,1 c
6. <i>B. firmus</i> (10 L/ha)	1.403,6 a	93,7 a	6,3 d	2.037,2 ab	100,0 a	0,0 bc	100,0 a	0,0 bc
7. <i>B. amyloliquefaciens</i> (1 L/ha)	1.531,2 a	92,0 ab	8,0 cd	1.909,6 b	100,0 a	0,0 c	100,0 a	0,0 c
8. <i>B. amyloliquefaciens</i> (10 L/ha)	1.333,2 a	69,1 bc	30,9 bc	1.377,2 b	98,8 a	1,2 c	98,8 a	1,2 c
Teste F	12,7**	14,4**	14,4**	11,1**	30,8**	30,8**	30,8**	30,8**
CV%	5,7	20,9	47,3	5,4	8,5	78,8	8,5	78,8

3 Para a análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{\text{Log}(x+5)}$, $^2 \arcsen \sqrt{x/100}$ para as análises estatísticas. Médias seguidas
4 de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. **significativo a 1% de
5 probabilidade, ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. Nos tratamentos realizados com as espécies de *Bacillus* foram utilizados 10
6 L/ha diluídos em água com volume de calda de 150 L/ha na concentração de 1×10^8 U.F.C./mL. O tratamento Carborfurano² 350 SC foi
7 realizado na dose de 5 L p.c/ha.

1 **CAPÍTULO 3 – ESPÉCIES DE *Bacillus* NO DESENVOLVIMENTO DE CANA-DE-**
2 **AÇÚCAR INFECTADA POR NEMATOIDES DE GALHA ***
3

4 Rivanildo Junior Ferreira^{1*}; Pedro Luiz Martins Soares², Rafael Bernal de Carvalho¹,
5 Jaime Maia dos Santos², Elder Simões de Paula Batista³ e José Carlos Barbosa⁴.

6 *Parte da dissertação de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) do autor. E-
7 mail: jferreirafcav.unesp@gmail.com

8 ^{1,3}Aluno de Pós - Graduação em Agronomia (¹Produção Vegetal) e (³Entomologia
9 Agrícola),

10 ²Professor Assistente Doutor e Nematologista – Departamento de Fitossanidade,

11 ⁴Professor Titular – Departamento de Ciências Exatas.

12 ^{1,2,3,4}UNESP (Universidade Estadual Paulista) – FCAV (Faculdade de Ciências
13 Agrárias e Veterinárias), Câmpus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato
14 Castellane, s/n. Jaboticabal-SP 14884-900.
15

16
17
18 **RESUMO**

19 Ferreira, R. J, P. L. M. Soares, R. B. Carvalho, J. M. Santos, E. S. P. Batista, J. C.
20 Barbosa. 2015. Espécies de *Bacillus* no desenvolvimento de cana-de-açúcar
21 infectada por nematoides de galha. *Nematropica* 41:00-00.
22

23 Os nematoides de galha causam perdas significativas e diminuem a vida
24 produtiva da cultura de cana-de-açúcar. Praticamente o único método de controle
25 utilizado é o químico e este vem tendo restrições ecotoxicológicas. O controle
26 biológico tem potencial como alternativa para o problema. Portanto, avaliaram-se
27 espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e o
28 desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar. Mudanças de cana-de-açúcar 'RB 86-
29 7515' plantadas individualmente em vasos de 10 L contendo substrato autoclavado à
30 base de areia grossa e terra (2:1). Em seguida os tratamentos *B. subtilis* (10 L/ha),

1 *B. firmus* (10 L/ha), *B. amyloliquefaciens* (10 L/ha) e Carbofurano 350 SC (5 L/ha –
2 tratamento padrão) foram aplicados e as mudas inoculadas com 5.000 ovos e
3 juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e *M. javanica*, em vasos separados,
4 além de uma testemunha apenas com nematoides. Aos 100 e 150 dias após a
5 inoculação e aplicação dos tratamentos procederam-se as avaliações de parâmetros
6 da planta e dos nematoides. Todos os tratamentos aumentam o número de perfilhos,
7 mas não controlam os nematoides.

8

9 Palavras-chave: *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. subtilis*, Controle biológico;
10 *Meloidogyne incognita*; *Meloidogyne javanica*

11

12

ABSTRACT

13 Ferreira, R. J, P. L. M. Soares, R. B. Carvalho, J. M. Santos, E. S. P. Bastista, J. C.
14 Barbosa. 2015. *Bacillus* species in the development of sugar cane infected by root-
15 knot nematodes . Nematropica 41:00-00.

16

17 Root-knot nematodes cause significant lost and decrease the productive life cycle of
18 the sugar cane crop. The only control method employed is the chemical one, which
19 has been facing ecotoxicological restrictions. Biological control has its potential as an
20 alternative. Therefore, it was evaluated *Bacillus* species for the control of
21 *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*, and the development of sugar cane plants.
22 The seedlings were formed in tubes and transplanted individually into 10 L pots
23 containing sterilized coarse sand/earth substrate (2:1). Following we applied the

1 treatments *B. subtilis* (10 L/ha), *B. firmus* (10 L/ha), *B. amyloliquefaciens* (10 L/ha),
2 Carbofuran 350 SC (5 L/ha – standard treatment), and inoculated the seedlings with
3 5,000 eggs and second stage juveniles of *M. incognita* and *M. javanica*, separately,
4 along with a control group (with nematodes). At 100 and 150 days after applying the
5 treatments we proceed with the evaluations of plant height, plant weight, root weight,
6 numbers of tillers and quantity of eggs and second stage juveniles of *M. incognita*
7 and *M. javanica* in the roots of each plant evaluated. In the pot assay, all treatments
8 increase the number of tillers but do not control the nematodes.

9

10 Key Words: *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. subtilis*, Biological control;
11 *Meloidogyne incognita*; *Meloidogyne javanica*

12

13

INTRODUÇÃO

14 A produção total de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) moída na safra
15 2013/14 foi de 658,8 milhões de toneladas, com aumento de 11,9% em relação à
16 safra 2012/13, que foi de 588,9 milhões de toneladas, significando um acréscimo de
17 69,9 milhões de toneladas em relação à safra anterior. O estado de São Paulo
18 permanece como o maior produtor, concentrando 51,43% (4.678,8 mil hectares) da
19 área plantada (Conab, 2014).

20 Vários são os problemas fitossanitários de solo que podem afetar a cultura de
21 cana-de-açúcar, entre esses estão os nematoides que comprometem drasticamente
22 a produtividade e a longevidade do canavial (Dinardo-Miranda, 2008). Mais de três

1 centenas de espécies já foram encontradas associadas à cultura, todavia,
2 *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood,
3 além de *Pratylenchus zae* Graham são as mais frequentes e consideradas espécies
4 de importância econômica (Cadet e Spaul, 2005). Em áreas comerciais, *M. javanica*
5 causa de 20 a 30% de redução de produtividade no primeiro corte de variedades
6 suscetíveis e *M. incognita* pode ocasionar perdas ainda maiores, ao redor de 40%.
7 Em casos em que a variedade atacada é muito suscetível e os níveis populacionais
8 estão muito altos, as perdas podem chegar até 50% da produtividade (Dinardo-
9 Miranda, 2008).

10 Atualmente o controle de nematoides, é feito principalmente com o auxílio de
11 nematicidas químicos (Novaretti e Reis 2009), método de controle mais fácil e
12 prático de ser utilizado do que outros devido o sistema de cultivo e a cultura ser
13 semi-perene, uma vez que, podem-se alcançar resultados favoráveis em um curto
14 período de tempo (Halbrent e James, 2003). Entretanto, apesar de ser eficiente, a
15 alta toxicidade causada pelos nematicidas químicos, tem levado ao longo dos
16 últimos anos a busca de alternativas menos prejudiciais ao homem, meio ambiente e
17 animais e de acordo com Berry *et al.* (2009), se estes forem retirados do mercado,
18 os agricultores teriam poucas opções de manejo para o controle de nematoides e
19 passariam a ter dificuldades de manter a produtividade da cana-de-açúcar.

20 Uma alternativa para o uso de nematicidas químicos que foi pouco
21 investigada na cultura de cana-de-açúcar é o desenvolvimento e utilização do
22 controle biológico. Este método tem se destacado como alternativa viável, de fácil

1 aplicação, muitas vezes de menor custo do que o químico e com o objetivo de
2 diminuir as perdas (Berry *et al.*, 2009).

3 Entre os inimigos naturais identificados como potenciais agentes de controle
4 biológico de nematoides, alguns são bactérias, tais como algumas espécies de
5 *Bacillus*. Essas bactérias são encontradas na rizosfera das plantas e por esta
6 característica são também conhecidas como rizobactérias. Têm capacidade de
7 invadir os tecidos internos das plantas, ou seja, são endofíticas facultativas, têm
8 potencial para favorecer o desenvolvimento das plantas e/ou promover o controle
9 biológico de nematoides (Stirling, 1991, Siddiqui e Mahmood, 1999, Sturz e Nowak,
10 2000; Tian *et al.*, 2007). Elas têm a capacidade de produzir antibióticos, enzimas e
11 toxinas, que agem diretamente causando a mortalidade dos diferentes estádios de
12 desenvolvimento dos nematoides e/ou indiretamente no comportamento, na
13 alimentação ou na reprodução de nematoides, no processo de reconhecimento
14 planta-hospedeiro, na indução de resistência, diminuindo a infecção das raízes e/ou
15 proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (Mankau, 1980, Stirling,
16 1991; Siddiqui e Mahmood, 1999; Perry e Moens, 2005; Tian *et al.* 2007; Machado *et*
17 *al.*, 2012).

18 A utilização de *B. subtilis* (1872PRBS-1) em plantas de tomateiro aumentou a
19 biomassa da parte aérea e reduziu a reprodução de *Meloidogyne* sp. (Araújo e
20 Marchesi, 2009). Dawar *et al.* (2008), observaram que *B. subtilis* manteve 100% de
21 germinação das sementes das plantas de feijoeiro e diminui o número de galhas nas
22 plantas.

1 Diante do exposto os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito de
2 espécies de *Bacillus* no controle de nematoides de galha chave e no
3 desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar.

4

5

6

MATERIAL E MÉTODOS

7 Os experimentos foram conduzidos em vasos a céu aberto no Departamento
8 de Fitossanidade da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal no período de 16/02 a
9 10/08/2014. As médias das temperaturas máximas, médias e mínimas no período
10 foram de 28,64; 21,59 e 15,86^o C, respectivamente, e a pluviosidade acumulada no
11 período foi de 1.339 mm.

12 A população de *M. javanica* utilizada foi oriunda de área de cultivo comercial
13 de quiabeiro (*Hibiscus esculentus* L.) na região de Piacatu-SP e a população de *M.*
14 *incognita* oriunda de área de cultivo de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) na região
15 de Barreiras – BA.

16 As populações foram previamente identificadas com base nos caracteres
17 morfológicos do padrão perineal, preparado conforme Taylor e Netscher (1974), na
18 morfologia da região labial dos machos (Eisenback *et al.*, 1981) e no fenótipo
19 isoenzimático para esterase, obtido pela técnica de Esbenshade e Triantaphyllou
20 (1990).

21 Ambas as populações foram mantidas em plantas de tomateiro (*Solanum*
22 *lycopersicom* L.) e a partir de amostras de raízes da referida cultura exibindo galhas,
23 preparou-se uma suspensão contendo ovos e juvenis de segundo estágio (J2) do

1 nematoide, pela técnica de Hussey e Barker (1973). A concentração da suspensão
2 foi estimada com auxílio de uma câmara de contagem de Peters (Southey, 1970),
3 em microscópio fotônico e ajustada para 1.000 ovos e juvenis de segundo estágio
4 (J2)/mL para utilização como inóculo.

5 Foram inoculados 10 mL da suspensão por muda de berinjela (*Solanum*
6 *melongena* L.) 'Comprida Roxa' com 30 dias, obtida em substrato orgânico
7 Plantmax® em bandejas de poliestireno, transplantada individualmente em vaso
8 contendo substrato (2 partes de areia : 1 parte de terra) autoclavado (a 120 °C ± 1
9 °C e 1 atm por uma hora), mantidos na casa de vegetação, para multiplicação das
10 populações.

11 Cerca de 90 dias após a inoculação, as raízes das plantas de berinjela foram
12 cuidadosamente retiradas e processadas, por trituração em liquidificador em solução
13 de hipoclorito de sódio de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973), obtendo
14 uma suspensão de ovos e juvenis de segundo estágio (J2). As concentrações das
15 suspensões de ovos e J2 foram estimadas com auxílio de uma câmara de contagem
16 de Peters (Southey, 1970), em microscópio fotônico e ajustada de modo a prover o
17 inóculo desejado de 500 ovos e juvenis de segundo estágio (J2) em 1 mL de
18 suspensão.

19 Foram preparados vasos de plástico de 10 L contendo substrato constituído
20 por uma mistura de areia e terra na proporção de 2:1, autoclavada conforme
21 mencionado anteriormente. O substrato foi irrigado e foram transplantadas mudas
22 com 45 dias de cana-de-açúcar 'RB 86-7515' formadas a partir de toletes com
23 aproximadamente 4 cm, plantados em tubetes com altura de 130 mm e 52 mm de

1 diâmetro, contendo substrato orgânico autoclavado, a base de fibras de coco
2 Plantmax® Cerca de 15 dias após o transplântio, as raízes foram parcialmente
3 descobertas e foram aplicados 2,5 mL de suspensão aquosa na concentração de $1 \times$
4 10^8 U.F.C./mL dos tratamentos testados *Bacillus subtilis*, *B. firmus* e *B.*
5 *amyloliquefaciens*, cedidos pela empresa Stoller do Brasil.

6 O nematicida químico Carborfurano 350 SC é um inseticida/nematicida
7 sistêmico do grupo dos carbamatos pertencente à empresa FMC Química do Brasil
8 Ltda. Foi distribuído uniformemente próximo às raízes. A seguir, as raízes de cada
9 planta foram inoculadas com 10 mL de suspensão contendo 5.000 ovos e juvenis de
10 segundo estágio (J2) de cada uma das espécies em vasos separados.
11 Posteriormente, as raízes foram recobertas com o substrato. Foi utilizado o
12 delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições
13 para cada uma das avaliações realizadas.

14 No decorrer da condução dos experimentos a irrigação do substrato nos
15 vasos foi efetuada de modo a suprir-se a quantidade de água mínima para
16 manutenção da turgescência celular, tendo em vista evitar-se a lixiviação dos
17 produtos.

18 Aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos e inoculação das raízes,
19 foram avaliados os possíveis efeitos de fitotoxidez dos produtos. Aos 100 e 150 dias
20 após a aplicação (DAA) dos tratamentos foram feitas as avaliações da altura da
21 parte aérea (APA) em cm, massa fresca das partes aéreas (MFPA) em g, massa
22 fresca das raízes (MFR) em g, número de perfilhos e o número de ovos e juvenis de
23 segundo estágio de *M. javanica* e *M. incognita* nas raízes. Os nematoides foram

1 extraídos das raízes pelos métodos de Hussey e Barker (1973) e aplicado pelo
2 método de flotação centrífuga em solução de sacarose com caulim Coolen e
3 D'Herde (1972). A seguir, a população dos nematoides nas amostras foi estimada ao
4 microscópio fotônico, com auxílio da câmara de contagem de Peters (Southey,
5 1970). Os experimentos não foram conduzidos até a colheita, devido à condição
6 desfavorável para o desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar em vasos.

7 As análises de variância foram realizadas com o software Agroestat (Barbosa
8 e Maldonado, 2011), através do teste F e quando significativo aplicado o Teste de
9 Duncan para comparação de médias.

10

11

RESULTADOS E DISCUSSÃO

12 Nas condições do presente estudo, para todos os tratamentos com *Bacillus*
13 em ambos os ensaios, não foram constatadas a ocorrência dos sintomas usuais de
14 fitotoxidez às plantas de cana-de-açúcar.

15 A variedade de cana-de-açúcar 'RB 86-7515', propiciou um desenvolvimento
16 populacional de *M. incognita* 15 vezes maior que *M. javanica*, aos 100 DAA. Aos 150
17 DAA *M. incognita* provocou significativa redução de 35% na altura da parte aérea,
18 120% na massa fresca das partes aéreas e 28% do número de perfilhos, em relação
19 a *M. javanica*. Isso evidencia a maior agressividade de *M. incognita* para esta
20 variedade de cana-de-açúcar, apesar de ambas as espécies terem apresentado uma
21 alta população nas raízes e um fator de reprodução $FR = 18$, segundo Oostenbrink
22 (1966), o que por sua vez evidencia que a variedade é suscetível e boa hospedeira
23 para ambas as espécies (Tabela 1). Entretanto, *M. javanica* foi mais agressivo do

1 que *M. incognita*, evidenciado pela massa fresca das raízes, que foi 23% menor, aos
2 100 DAA. Contudo, Dinardo-Miranda (1999) e Garcia *et al.* (1997) constataram maior
3 agressividade de *M. incognita* em relação a *M. javanica* em outras variedades.
4 Barbosa *et al.* (2009) constataram que *M. javanica* foi mais agressivo do que *M.*
5 *incognita* para o desenvolvimento das matérias frescas das partes aéreas e das
6 raízes na referida cultura, em variedades diferentes, apesar da menor multiplicação
7 da espécie, semelhante ao obtido no presente estudo. De fato, vários trabalhos
8 constataram que muitos são os fatores que interferem nas perdas causadas pelos
9 nematoides, entre os quais se destacam a variedade da cultura, a espécie de
10 nematoide e o nível de infestação (Dinardo-Miranda, 1990; Dinardo-Miranda, 1999;
11 Barbosa *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2013).

12 Para a altura da parte aérea, o tratamento com *B. subtilis* (10 L/ha) reduziu o
13 desenvolvimento da altura da parte aérea em relação aos demais tratamentos
14 (Tabela 1). Para a interação espécie e tratamento, aos 100 DAA, *B. subtilis* (10 L/ha)
15 diminuiu a altura da planta quando infectada por *M. incognita* em relação aos demais
16 tratamentos (Tabela 2). *Bacillus amyloliquefaciens* aumentou o número de perfilhos
17 quando infectada com *M. javanica* (Tabela 2). A dose de 10 L/ha com *B. subtilis*
18 utilizada comprometeu o desenvolvimento desta variável, assim como a menor
19 população desta espécie estimada em relação à outra foi capaz de comprometer
20 mais o desenvolvimento das raízes, como já observado e discutido anteriormente.

21 Em estudo do controle de *Meloidogyne* sp. e o crescimento de cana-de-
22 açúcar, em função da aplicação de *B. subtilis* no solo após multiplicação em vinhaça
23 em suspensão aquosa, Cardozo e Araújo (2011), observaram benefícios de estímulo

1 ao crescimento na referida cultura apenas quando utilizaram *B. subtilis* em
2 suspensão aquosa. Esses mesmos autores observaram o aumento na altura e na
3 massa das partes aéreas secas. Araújo e Marchesi (2009), avaliaram o efeito de *B.*
4 *subtilis* (PRBS-1) como promotor de crescimento e agente de controle de
5 nematoides formadores de galha (*Meloidogyne* spp.) no cultivo de tomateiro e
6 constataram a redução da massa fresca de raízes. Também, a utilização de isolados
7 de *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*
8 L.) em casa de vegetação, não aumentou significativamente a massa de raízes
9 (Fernandes et al., 2013). Todavia, Vaz et al. (2011) verificaram que a microbiolização
10 de sementes com *B. subtilis* no controle de populações puras e mistas de *M.*
11 *javanica* e *M. incognita* em tomateiros cultivados em casa de vegetação, promoveu o
12 aumento da biomassa das plantas. Alguns autores já observaram que as
13 rizobactérias podem apresentar efeitos benéficos, prejudiciais ou neutros,
14 dependendo da cultura, espécie de rizobactéria e isolado utilizado (Luz, 1996;
15 Schippers et al., 1987; Vaz et al., 2011).

16 O maior aumento da massa frescas das partes aéreas foi obtido com
17 Carbofurano 350 SC (5 L/ha), em relação aos demais tratamentos. Todos os
18 tratamentos aumentaram o número de perfilhos em relação à Testemunha (com
19 nematoides), aos 150 DAA, apesar de não terem reduzido o número de nematoides
20 na cultura de cana-de-açúcar 'RB 86-7515' (Tabela 1). Segundo Silva et al. (2007),
21 Wiedenfeld (2003) e Silva et al. (2008) quanto maior perfilhamento melhor, já que
22 leva a um crescimento inicial rápido e uniforme, atingindo um bom estande, o que
23 possibilita o rápido fechamento de entrelinha e o controle mais efetivo das plantas

1 daninhas, além da cobertura homogênea do solo, que promove eficiente
2 aproveitamento da energia luminosa pela planta, podendo refletir em maior
3 produtividade. Dinardo-Miranda *et al.* (2003), avaliaram o efeito dos nematicidas
4 aldicarbe, carbofurano e terbufós no plantio da cana-de-açúcar, em áreas infestadas
5 por nematoides, e constataram que os mesmos contribuíram para incrementos de
6 produtividade variando de 14,2 a 25,5 t/ha.

7 Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo *et al.* (2012), com o
8 tratamento de sementes de soja 'BRS 282' com carbofurano ou *B. subtilis*, que
9 contribuíram para ganhos significativos, no crescimento da referida cultura em solo
10 infestado com *Meloidogyne* sp. A referida espécie de *Bacillus* é considerada como
11 promotora de crescimento de plantas, devido à produção de fitorreguladores
12 vegetais na rizosfera, que promovem o desenvolvimento das plantas (Machado *et*
13 *al.*, 2012).

14 Foi constatado por Barros *et al.* (2003) que o uso de nematicidas de forma
15 continua em canaviais tem sido questionado quanto à eficácia de controle e pela
16 inconstância de resultados (Barros *et al.*, 2003). Também, Dinardo-Miranda *et al.*
17 (2010), com a finalidade de definir a melhor época para aplicar nematicidas em
18 soqueiras de início de safra, conduziram oito experimentos em canaviais colhidos
19 em abril e maio, com aplicação de nematicidas de 10 a 180 dias depois da colheita.
20 Somente em um ensaio observou-se efeito dos nematicidas sobre as populações de
21 *M. javanica*, mas, na maioria deles, os nematicidas reduziram as populações de *P.*
22 *zeae* e *P. brachyurus*. Não foram observados aumentos de produtividade devido ao
23 tratamento nematicida em seis dos oito ensaios, embora todas as áreas

1 experimentais apresentassem infestações de nematoides passíveis de causar danos
2 econômicos à cultura.

3 A densidade populacional de espécies de nematoides aumentou em várias
4 áreas após o tratamento com nematicidas comparado com as áreas não tratadas.
5 Os nematicidas aparentemente protegem o desenvolvimento das raízes das plantas
6 dos danos, resultando em uma grande biomassa de raízes. O nematicida pode
7 manter a densidade populacional do nematoide baixa durante boa parte da safra.

8 Em outros casos, como o efeito nematicida é por um período curto ou
9 eliminado, os nematoides sobreviventes podem produzir um grande número de
10 descendentes devido às raízes abundantes (Schmitt *et al.*, 1983; Sipes e Schmitt,
11 1998). Tal fato foi observado neste e em outros estudos, pode ser atribuído ao
12 período curto de ação do nematicida carbofurano (conforme consta na bula são 90
13 dias de carência, em geral, o período de ação é menor) assim como os tratamentos
14 com as espécies de *Bacillus*, em relação ao ciclo longo da cultura em questão,
15 segundo Dinardo-Miranda e Menegatti (2004), as raízes devem ficar protegidas do
16 parasitismo dos nematoides por no máximo o período de carência e o carbofurano
17 proporcionou mais de 90% de eficiência de controle de *M. javanica*, *P. zea* e *P.*
18 *brachyurus* aos 90 dias após a aplicação em relação à testemunha, como observado
19 no trabalho de (Dinardo-Miranda et al., 2010). Em decorrência disso pode haver uma
20 redução inicial significativa dos nematoides associados às raízes na cana-de-açúcar
21 como observado em Dinardo-Miranda et al., 2010, permitindo um maior e mais
22 sadio sistema radicular que após a ação nematicida do produto e a cultura ter um
23 longo ciclo, a população remanescente terá condições adequadas e favoráveis para

1 o aumento populacional. Todavia, poderá resultar em incrementos significativos na
2 produtividade como tem sido constatado (Dinardo-Miranda et al., 1995; Dinardo-
3 Miranda e Menegatti, 2010; Dinardo-Miranda et al., 2010).

4 Fernandes *et al.* (2013) verificaram que pela da utilização de isolados de
5 *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* na cultura do feijoeiro em casa de
6 vegetação, nenhum isolado bacteriano reduziu o número de galhas induzidas pelo
7 nematoide. Tais resultados são diferentes dos obtidos por Fernandes *et al.* (2014),
8 que constataram que a combinação entre microbiolização de sementes com *B.*
9 *subtilis* e a aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) no solo reduziram em
10 mais de 80% o número de ovos e J2 de *M. javanica* em tomateiro, em comparação
11 com a adoção de apenas um dos tratamentos isoladamente.

12 Também, é diferente do resultado observado por Araújo e Marchesi (2009),
13 que constataram que *B. subtilis* (PRBS-1) reduziu a reprodução de nematoide
14 formador de galha em raízes de tomateiro, sob condições de casa de vegetação.

15 De fato já foi observado que a espécie e até o isolado do agente de controle
16 biológico pode apresentar eficácia de controle diferente dependendo da cultura e da
17 espécie de nematoide utilizada (Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000; Dallemole-Giaretta, 2008).
18 Muitos fatores interferem na grandeza dos danos causados por nematoides, entre os
19 quais as espécies presentes na área, o nível populacional, a variedade cultivada e
20 as condições das raízes para penetração. Em canaviais com variedades suscetíveis
21 e níveis populacionais muitos altos, as perdas provocadas por nematoides, reduzem
22 as produtividades das soqueiras e conseqüentemente a longevidade do canavial
23 (Dinardo-Miranda, 2008).

1 Nas condições do presente trabalho e de acordo com os dados obtidos,
2 conclui-se que:

3 - O tratamento Carbofurano 350 SC (5 L/ha) aumenta a massa fresca das
4 partes aéreas;

5 - Com infecção de *M. incognita* na cana-de-açúcar, *Bacillus subtilis* reduz o
6 desenvolvimento da altura da parte aérea e quando infectada com *M. javanica* *B.*
7 *amyloliquefaciens* aumenta o número de perfilhos de cana-de-açúcar;

8 - Todos os tratamentos com *Bacillus* (*B. subtilis*; *B. firmus* e *B.*
9 *amyloliquefaciens* 10 L/ha, 1×10^8 UFC/ mL) e Carbofurano 350 SC (5 L/ha)
10 aumentam o número de perfilhos, mas não controlam *M. javanica* e *M. incognita*.

11

12

13

LITERATURA CITADA

14

15 Araújo, F. F., and G. V. P. Marchesi. 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da
16 meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. *Ciência Rural* 39:1558-
17 1561.

18 Araújo, F. F., R. J. Bragante, and C. E. Bragante. 2012. Controle genético, químico e
19 biológico de meloidoginose na cultura da soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 42:
20 220-224.

21 Barbosa, J.C. and W. Maldonado Jr. 2011. *Agroestat - Sistema para Análises*
22 *Estatísticas de Ensaios Agronômicos, Versão 1.1.0.696, Jaboticabal.*

- 1 Barbosa, B. F. F., J. M. Santos, J. C. Barbosa, P. L. M. SOARES., A. R. Ruas, and
2 R. B. Carvalho. 2013. Aggressiveness of *Pratylenchus brachyurus* to sugarcane,
3 compared with key nematode *P. zaeae*. *Nematropica* 43 : 119-130.
- 4 Barbosa, B. F. F., J. M. Santos, P. L. M. Soares and J. C. Barbosa. 2009. Avaliação
5 comparativa da agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à variedade
6 SP 911049 de Cana-de-açúcar. *Nematologia Brasileira* 33 : 243-247.
- 7 Barros, A. C. B., R. M. Moura, and E. M. R. Pedrosa. Influência da aplicação
8 conjunta de nematicida com calcário, cupinicida ou torta de filtro na eficiência do
9 nematicida em cana-de-açúcar. 2003. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 25.
10 Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa 236 p.
- 11 Berry. S. D., V. W. Spaul and P. Cadet. 2009. Field assessment of biologically-based
12 control products against nematodes on sugarcane in South Africa. *African Plant*
13 *Protection* .15 : 1–12.
- 14 Cadet, P., and V. W. Spaul. 2005. Nematode parasites of sugarcane. Pp. 645- 674
15 in M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, ed. *Plant parasitic nematodes in subtropical*
16 *and tropical agriculture*. C.A.B. Wallingford: International Institute of Parasitology.
- 17 Cardozo, R. B., and Araujo, F. F. 2011. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça
18 e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de*
19 *Engenharia Agrícola e Ambiental* 15 : 1283-1288.
- 20 Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de
21 Cana-de-Açúcar, Segundo Levantamento, agosto. Companhia Nacional de
22 Abastecimento Brasília: Conab 2014.

- 1 Coolen, W. A. and C. J. A D'Herde. 1972. Method for the quantitative extraction of
2 nematodes from plant tissue. Ghent: nematology and entomology research station.
3 77.
- 4 Dallemole-Giaretta, R. Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia*
5 *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento
6 de tomateiro. Viçosa. 2008. 83 p. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de
7 Viçosa, (MG), 83 p. 2008.
- 8 Dawar, S., M. Tariq, and M.J. Zaki. 2008. Application of *Bacillus* species in control of
9 *Meloidogyne javanica* (treub) chitwood on cowpea and mash bean. Pakistan Journal
10 of Botanyaf, 40: 439-444.
- 11 Dinardo-Miranda, L. L. 1990. Patogenicidade de *Pratylenchus brachyurus* e
12 *Pratylenchus zaeae* (Nemata, Pratylenchidae) a duas variedades de cana-de-açúcar
13 (*Saccharum* sp.). M.S. dissertation, College of Agriculture Luiz de Queiroz,
14 Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 15 Dinardo-Miranda, L. L. 1999. Reação de variedades de cana-de-açúcar ao
16 parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. Nematologia Brasileira. 23 : 76-
17 83.
- 18 Dinardo-Miranda, L.L. 2008. Fitossanidade. Pp. 405-422. in L.L. Dinardo-Miranda, A.
19 C. M. Vasconcelos, M. G. A. Landel, 1 ed. Cana-de- açúcar. Campinas, SP: Instituto
20 Agrônômico SP.
- 21 Dinardo-Miranda, L.L. and J. V. Fracasso. 2010. Efeito da torta de mamona sobre
22 populações de nematoides fitoparasitos e a produtividade da cana-de-açúcar,
23 Nematologia Brasileira. 34: 68-71.

- 1 Dinardo-Miranda, L.L., J. V. Fracasso, and V.P Costa. 2010. influência da época de
2 aplicação de nematicidas em soqueiras colhidas em início de safra sobre as
3 populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar.
- 4 Dinardo-Miranda, L.L., W.R.T. Novarttei, J.L. Morelli and E.J. Nelli. 1995.
5 Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne*
6 *javanica* em condições de campo. Nematologia Brasileira, 19 : 60-66.
- 7 Dinardo-Miranda, LL., M. A. Gil, A.L. Coelho, V. Garcia and C. C. Menegatti. 2003.
8 Efeito da torta de filtro e de nematicidas sobre as infestações de nematoides e
9 produtividade da cana-de-açúcar. Nematologia Brasileira 27 :61-67.
- 10 Dinardo-Miranda, L. L. and C. C. Menegatti. 2004. Efeito de nematicidas aplicados
11 no plantio de na soqueira da cana-de-açúcar. Nematologia Brasileira 28 : 87-96.
- 12 Eisenback, J.D., H. Hirschmann, J. N Sasser, and A. C. Triantaphyllou. 1981. A
13 guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne*
14 species) with a pictorial key. Pp. 48. Raleigh: The Departments of Plant Pathology
15 and Genetics of North Carolina State University and United States Agency for
16 International Development.
- 17 Esbenshade, P. R. and A. C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the
18 identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 22:10-15.
- 19 Fernandes, R. H., B. S. Vieira, C. A. G. Fuga and E. A. Lopes. 2014. *Pochonia*
20 *chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M.*
21 *javanica* em mudas de tomateiro. Bioscience . Journal 30 :194-200.

- 1 Fernandes, R. H.; E. A. Lopes, B. S. Vieira and A. F. Bontempo. 2013. Controle de
2 *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp. Revista
3 Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 7: 76 - 81.
- 4 Garcia, V., S. F. Silva, and L. L. Dinardo-Miranda. 1997. Comportamento de
5 variedades de cana-de-açúcar em relação a *Meloidogyne incognita*. Revista
6 Nacional do Alcool e Açúcar 17:14-19.
- 7 Halbrecht, J. M. and A. L. M. James. 2003. Crop rotation and other cultural practices.
8 Pp. 909-930 In: Chen, Z. X.; Chen, S. Y.; Dickson, D. W. 1.ed. Nematology
9 advances and perspectives – nematode management and utilization. Beijing: CABI
10 publishing,
- 11 Higo-Díaz, L., J. M. Bourne., B. R. Kerry and M. G. Rodríguez. 2000.
12 Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation
13 and screening. International Journal of Pest Management 46:277-284.
- 14 Hussey, R. S. and K. R. Barker. 1973. A Comparison of methods of collecting inocula
15 of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-
16 1028.
- 17 Luz, W. C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção.
18 Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo 4 : 1-49.
- 19 Machado, V., D. L. Berlitz, A. T. S. Matsumura, R. C. M. Santin, A. Guimarães, M. E.
20 Silva, and L. M. Fiuza. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de
21 fitonematóides. Oecologia Australis. 16 : 165 -182.
- 22 Mankau, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual*
23 *Review of Phytopathology*, 18: 415-40.

- 1 Novaretti, W. R. T. and A. M. Reis. 2009. Influência do método de aplicação de
2 Nematicida no controle de *Pratylenchus zae* em soqueiras de cana-de-açúcar e
3 definição dos níveis de danos e de controle. *Nematologia Brasileira* 33 : 83-89.
- 4 Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and
5 plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool* 66 : 1-46.
- 6 Perry, R. N., M. Moens. *Plant nematology*. Pondicherry: Biddles, 2005. 447p.
- 7 Schippers, B., A. W. Bakker, and P. A. H. M. Bakker. 1987. Interações of deleterious
8 and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices.
9 *Annual Review of Phytopathology*. 25: 339–358.
- 10 Schmitt, D. P., F. T. Corbin, and L. A. Nelson. 1983. Population dynamics of
11 *Heterodera glycines* and soybean response in soils treated with selected nematicides
12 and herbicides . *Journal of Nematology*. 15: 432-437.
- 13 Siddiqui, Z. A. and I. Mahmood. 1999. Role of bacteria in the management of plant
14 parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69: 167-179.
- 15 Silva, M. A., G. J. C. Gava, M. M. Caputo, R. P. Pincelli, E. M. Jerônimo, and J. C. S.
16 Cruz. 2007. Uso de reguladores de crescimento como potencializadores do
17 perfilhamento e da produtividade em cana-soca. *Bragantia* 66 : 545-552.
- 18 Silva, M. A, E. M. Jeronimo, and A. D'Col Lúcio. 2008. Perfilhamento e produtividade
19 de cana-de-açúcar com diferentes alturas de corte e épocas de colheita. *Pesquisa*
20 *Agropecuária Brasileira* 43: 979-986.
- 21 Sipes, B. S. and D. P. Schmit. 1998. *Nematodes- Pesticide Interactions*. 1998. Pp.
22 173-185. In Bartels. J. M, Hatfield. J. M, Baenziger. P.S and Bigham. J. M. 36 ed.
23 *Plant nematodes Interections*. Madison, Wisconsin.

- 1 Southey, J. F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes.
2 London: Minist. Agric. Fisch. Fd. Technical Bulletin No. 2. 148 p.
- 3 Stirling, G.R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress,
4 Problems and Prospects. CAB International, Wallington, UK. 282p.
- 5 Sturz, A.V. and Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the
6 strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied Soil
7 Ecology 15: 183-190.
- 8 Taylor, A. L. and C. Netscher.1974. An improved technique for preparing perineal
9 patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20:268-269.
- 10 Tian, B.Y.; J.K. Yang, L. H. Lian, C. Y. Wang, and, K. Q. Zhang. 2007. Role of neutral
11 protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. Applied
12 Microbiology and Biotechnology, 74: 372-380.
- 13 Vaz, M. V., E. J. Canedo, J. C. Machado, B. S. Vieira, and E. A. Lopes. 2011.
14 Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus*
15 *subtilis*. Perquirere 8 : 203 – 212.
- 16 Wiedenfeld, B. 2003. Enhanced sugarcane establishment using plant growth
17 regulators. Journal of American Society of Sugarcane Technologists 23 : 48-61.

1 **Tabela 1.** Efeito de espécies de *Bacillus* no desenvolvimento de cana-de-açúcar 'RB 86 – 7515' e no controle de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, aos 100 e 150 dias após a aplicação (DAA), Jaboticabal 2014.

Espécie	Altura da parte aérea (cm)		Massa das partes aéreas frescas (g)		Massa das raízes frescas (g)		Número de perfilhos		Ovos e J2 nas raízes	
	100 DAA	150 DAA	100 DAA	150 DAA	100 DAA	150 DAA	100 DAA	150 DAA	100 DAA	150 DAA
<i>M. javanica</i>	39,13	59,03 a	211,85	465,50 a	118,50 b	91,00	4,35	5,65 a	15.342,30 b	93.339,19
<i>M. incognita</i>	37,29	43,42 b	152,75	210,85 b	146,45 a	87,95	4,40	4,40 b	22.9564,24 a	91.720,12
Teste F	1,11 ^{NS}	20,14 ^{**}	2,42 ^{NS}	25,64 ^{**}	5,99*	0,08 ^{NS}	0,00 ^{NS}	4,82*	23,09 ^{**}	0,02 ^{NS}
Tratamento										
1. <i>Bacillus subtilis</i> (10 L/ha)	29,61 b	37,81 c	184,75	202,75 c	136,87	80,00	7,37 a	5,12 a	51.497,40	57.910,05
2. <i>Bacillus firmus</i> (10 L/ha)	39,97 a	45,60 c	155,75	277,62 c	128,50	88,75	3,50 b	5,50 a	173.323,90	62.285,14
3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (10 L/ha)	42,06 a	52,80 b	259,87	395,25 ab	142,12	94,62	5,37 ab	5,75 a	131.467,26	243.287,74
4. Carborfurano 350 SC (5 L/ha)	38,50 a	65,26 a	154,62	555,12 a	142,12	106,75	2,87 b	5,87 a	81.439,98	54.151,47
5. Testemunha (com nematoides)	40,91 a	54,66 b	156,50	260,12 bc	129,37	77,25	2,75 b	2,87 b	174.537,81	45.013,88
Teste F	6,52 ^{**}	6,98 ^{**}	1,13 ^{NS}	6,20 ^{**}	0,29 ^{NS}	0,99 ^{NS}	5,15 ^{**}	3,77*	1,21 ^{NS}	1,83 ^{NS}
Teste F para Interação Espécie x Tratamento	6,91 ^{**}	1,18 ^{NS}	2,20 ^{NS}	0,63 ^{NS}	1,35 ^{NS}	1,09 ^{NS}	0,90 ^{NS}	3,03*	1,93 ^{NS}	2,38 ^{NS}
Cv(%)	14,44	21,48	65,96	47,02	27,27	37,68	56,33	35,83	20,62	32,21

3 Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. **Diferença significativa pelo teste F a 1% de probabilidade. ^{NS}Diferença não significativa. Para a análise estatística, os dados da população de nematoides foram transformados em log (x+5). Nos tratamentos realizados com as espécies de *Bacillus* foram utilizados 10 L/ha de solução aquosa em volume de calda de 150 L/ha na concentração de 1 x 10⁸ U.F.C/mL. O tratamento Carborfurano 350 SC foi realizado na dose de 5 L p.c/ha. Cv(%)= Coeficiente de Variação.

Tabela 2. Desdobramento da interação espécie de nematoide e tratamento, para altura da parte aérea (cm) e número de perfilhos avaliados aos 100 e 150 dias após a aplicação - Jaboticabal 2014.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)		Número de perfilhos		Teste F
	100 DAA		150 DAA		
	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	
1. <i>Bacillus subtilis</i>	20,37 b B	38,85 aA	5,75 aA	4,50 bc A	0,96 ^{ns}
2. <i>Bacillus firmus</i>	41,85 a A	38,07 aA	4,50 aA	6,50 ab A	2,47 ^{ns}
3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	39,00 a A	44,00 aA	3,50 aB	8,00 a A	12,49**
4. Carborfurano 350 SC	40,85 a A	36,15 aA	5,25 aA	6,50 ab A	0,96 ^{ns}
5. Testemunha (com nematoides)	43,85 a A	37,97aA	3,00 aA	2,75 c A	0,04 ^{ns}
Teste F	12,07**	1,36 ^{ns}	-	1,64 ^{ns}	5,15**

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. **Diferença significativa pelo teste F a 1% de probabilidade. ^{ns}não significativa. Nos tratamentos realizados com as espécies de *Bacillus* foram utilizados 10 L/ha de solução aquosa em volume de calda de 150 L/ha na concentração de 1 x 10⁸ U.F./mL. O tratamento Carborfurano 350 SC foi realizado na dose de 5 L p.c/ha.

1
2
3

4
5
6
7