

**MARINA GUIMARÃES PACIFICO**

***Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DO COMPLEXO DE DOENÇAS  
CAUSADAS POR *Fusarium-Meloidogyne* EM ALGODOEIRO**

**Botucatu**

**2021**



**MARINA GUIMARÃES PACIFICO**

***Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DO COMPLEXO DE DOENÇAS  
CAUSADAS POR *Fusarium-Meloidogyne* EM ALGODOEIRO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

**Botucatu**

**2021**

P117b	<p>Pacifico, Marina Guimarães</p> <p>Bacillus spp. no controle biológico do complexo de doenças causadas por Fusarium-Meloidogyne em algodoeiro / Marina Guimarães Pacifico. -- Botucatu, 2021</p> <p>127 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu</p> <p>Orientador: Wagner Bettiol</p> <p>1. Agricultura. 2. Proteção de Plantas. 3. Controle Biológico. 4. Rizobactérias. 5. Integração fungo-nematoide. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DO COMPLEXO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *Fusarium-Meloidogyne* EM ALGODOEIRO

AUTORA: MARINA GUIMARÃES PACIFICO

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Virtual)  
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente

Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO (Participação Virtual)  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Profa. Dra. BÁRBARA ECKSTEIN (Participação Virtual)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr DANIEL WINTER HECK (Participação Virtual)  
Plant Pathology / Cornell University

Botucatu, 12 de julho de 2021



## AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família, por tudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Unesp Câmpus de Botucatu, pela oportunidade.

Ao professor Wagner Bettiol, pela orientação no doutorado, por todos os ensinamentos, e pelos incentivos durante a minha carreira e trajetória profissional.

Além da amizade e mentoria para as melhores escolhas da vida e por sempre acreditar no meu potencial.

À Bárbara Eckstein, por compartilhar seu conhecimento, pela ajuda no desenvolvimento e execução do trabalho, pela amizade e por me receber em Brasília.

À Dra. Regina Carneiro, pelas contribuições no trabalho.

Ao Prof. Pedro Luiz Martins Soares, pelas contribuições e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao Wandinho, pela amizade, risadas e por me ajudar na manutenção do trabalho em Jaboticabal.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental "Raquel Ghini" da Embrapa Meio Ambiente, pela amizade, ajuda nas atividades e por vivenciar momentos tão importantes.

À Embrapa Meio Ambiente, por disponibilizar toda estrutura de trabalho, e aos funcionários do LMA, pelos ensinamentos e auxílio nas atividades do projeto.

De forma especial, à Laura Bononi, Lucas Guedes, Peterson, David, Mirian, Leo, Martinha, Neusa, Anamaria, Lais, Lilian e Thiago, primeiramente pela amizade, risadas e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pois sem vocês isso não seria possível.



## RESUMO

O Brasil é o quarto maior produtor e o segundo exportador de algodão do mundo. A murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - *Fov*) e a meloidoginose (*Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 - *Mi*) causam sérios problemas às plantas, tanto isoladamente quanto em associação. O controle dessas doenças é difícil, oneroso e acarreta perdas de produtividade. Além do uso de variedades resistentes, uma alternativa, para ambos os patógenos, é o controle biológico, pois, além da eficiência, diminui a pressão da utilização de produtos químicos. Entre os agentes de biocontrole, *Bacillus* spp. têm se destacado no controle de doenças causadas por esses patógenos. O objetivo do presente trabalho foi selecionar e caracterizar isolados de *Bacillus* antagonistas a ambos os patógenos, bem como selecionar isolados promotores de crescimento das plantas. Para alcançar esses objetivos, foram realizados testes *in vitro* com 41 isolados de *Bacillus* (35 obtidos de algodoeiros, cinco da coleção da Embrapa Meio Ambiente e um produto comercial) quanto à caracterização bioquímica (produção de sideróforos, ácido indolacético, ácido cianídrico, catalase, solubilização de fosfato e assimilação de nitrogênio), à inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Fov*, e sobre a eclosão e a mortalidade de juvenis de *Mi*. Os isolados selecionados *in vitro* foram testados em casa de vegetação para verificar o potencial em controlar *Fov* e *Mi* raças 3 e 4, isoladamente e com ambos os patógenos, além de ensaios para a promoção de crescimento de plantas. Os isolados selecionados na fase final foram identificados molecularmente. Para produção de ácido indolacético, assimilação de nitrogênio, sideróforos e catalase 20, 25, 23 e 21 isolados, respectivamente, apresentaram resultados positivos. Na inibição do crescimento micelial, 11 isolados apresentaram antagonismo a *Fov* e 15 reduziram significativamente a germinação de esporos. Onze isolados causaram mortalidade significativa de juvenis de *Mi* e quatro proporcionaram as menores áreas abaixo da curva de progresso da eclosão de ovos. Nesta fase foram selecionados os isolados S2527, S2545 e AP03. Esses isolados, bem como a mistura dos mesmos, foram avaliados quanto à promoção de crescimento de plantas e sobre o fator de reprodução dos nematoides. A mistura contendo os isolados AP03+S2527 promoveu o crescimento de plantas de algodão em rizotrons, aumentando a altura, o diâmetro do caule e os pesos frescos da parte aérea e do sistema radicular. Os isolados S2527, S25245 e AP03 reduziram em, aproximadamente, 76% o fator de

reprodução de *Mi* aos 100 dias. Dessa maneira, esses isolados e suas misturas foram testados sobre o complexo *Fusarium-Meloidogyne* em casa-de-vegetação, sendo observado que os isolados AP03, S2545, S2527 e suas misturas foram eficientes em controlar o complexo *Fusarium-Meloidogyne*, com aproximadamente 56% de redução do número de ovos por planta aos 60 dias e 85% de redução do número de ovos aos 120 dias após a semeadura. Além disso, esses isolados aumentaram o número de planta que sobreviveram na presença de ambos os patógenos. Esses três isolados foram identificados como *Bacillus velezensis*.

**Palavras-chave:** controle biológico; *bacillus*; galha; fusariose; algodão.

## ABSTRACT

Brazil is the fourth largest producer and the second exporter of cotton in the world. *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - *Fov*) and nematode root-knot (*Meloidogyne incognita* races 3 and 4 - *Mi*) are destructive to plants, both alone and in association. The control of these diseases is difficult, costly and leads to losses in productivity. In addition to the use of resistant varieties, an alternative, for both pathogens, is biological control, because, in addition to efficiency, it reduces the pressure of using chemical products. Among the biocontrol agents, *Bacillus* spp. has stood out in the control of diseases caused by these pathogens. The aim was to select and characterize the antagonistic *Bacillus* to both pathogens, as well as select that promote plant growth. To achieve these objectives, *in vitro* tests were carried out with 41 *Bacillus* isolates (35 obtained from cotton, five from the Embrapa Environment collection and one commercial product) for biochemical characterization (production of siderophores, indolacetic acid, hydrocyanic acid, catalase, phosphate solubilization and nitrogen assimilation), inhibition of mycelial growth and *Fov* spore germination, and on the hatching and mortality of *Mi* juveniles. The isolates selected *in vitro* were tested in a greenhouse to verify the potential to control *Fov* and *Mi* races 3 and 4, alone and with both pathogens, in addition to assays for the promotion of plant growth. Those selected were identified molecularly. For production of indolacetic acid, assimilation of nitrogen, siderophores and catalase 20, 25, 23 and 21 isolates, respectively, showed positive results. In the inhibition of mycelial growth, 11 isolates showed antagonism to *Fov* and 15 significantly reduced spore germination. Eleven isolates caused significant mortality of *Mi* juveniles and four provided the smallest areas below the egg hatch progress curve. In this phase, isolates S2527, S2545 and AP03 were selected. These isolates, as well as their mixture, were evaluated for the promotion of plant growth and for the nematode reproduction factor. The mixture containing the AP03+S2527 isolates promoted the growth of cotton plants in rhizotrons, increasing the height, stem diameter and fresh weight of shoots and roots. The isolates S2527, S25245 and AP03 reduced the reproduction factor of *Mi* by approximately 76% at 100 days. In this way, these isolates and their mixtures were tested on the *Fusarium-Meloidogyne* complex in greenhouse, and it was observed that the isolates AP03, S2545, S2527 and their mixtures were efficient in controlling the *Fusarium-Meloidogyne* complex, with approximately 56% of reduction in the number of eggs per plant at 60 days and 85%

reduction in the number of eggs at 120 days after sowing. In addition, these isolates kept the plant alive longer in the presence of both pathogens. These three isolados were identified as *Bacillus velezensis*.

**Keywords:** biological control; *bacillus*; root-knot nematode; fusarium wilt; cotton.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Isolados de Bacillus que apresentaram halos de inibição contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro ..... 57
- Figura 2 - Isolados de Bacillus que não exibiram atividade antagônica contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro .....58
- Figura 3 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelo isolado de Bacillus S2545 contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro, nas concentrações 5% (A) e 10% (B). Test – Testemunha (100% BDA).  
1,2,3,4,5 – Dia da multiplicação do metabólito .....63
- Figura 4 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelo isolado de Bacillus S2548 contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro, nas concentrações 5% (A) e 10% (B). Test – Testemunha (100% BDA). 1, 2, 3, 4, 5 – Dia da multiplicação do metabólito .....63
- Figura 5 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzido pelo isolado de Bacillus AP 210 contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro, na concentração de 10% ao quarto dia da multiplicação. Test – Testemunha (100% BDA) .....64
- Figura 6 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzido pelos isolados de S2548 (A) e S2545 (B) contra Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, in vitro, na concentração de 10% ao terceiro dia da multiplicação. Test – Testemunha (100% BDA) .....64
- Figura 7 - Efeito dos isolados de Bacillus spp. na altura, área foliar, índice SPAD, diâmetro e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7501 WS, aos 80 dias. Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade) .....69
- Figura 8 - Efeito dos isolados de Bacillus spp. na altura, área foliar, índice SPAD, diâmetro e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar FM 975 WS, aos 80 dias. Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade) .....70
- Figura 9 - Algodoeiros tratados com isolados de Bacillus, separadamente ou em mistura, desenvolvidos em rizotrons, aos 54 dias após semeadura. 1- Testemunha. 2- AP03. 3- S2545. 4- S2527. 5- AP03+S2545. 6- AP03+S2527. 7- S2545+S2527. 8- Quartzo® .....72

- Figura 10 - Efeitos de espécies de Bacillus, separadamente ou em mistura, na cultivar de algodão FM 975 WS aos 50 dias após sementeira desenvolvidos em rizotrons. A – Altura (cm). B – Área foliar (cm<sup>2</sup>). C- Diâmetro (mm). D- Comprimento de raízes (cm). E- Peso fresco da raiz (g)..... 73
- Figura 11 - Colonização in vitro de raízes de algodão variedade FM 975 WS por espécies de Bacillus. A- Testemunha. B- S2527.C- S2535. D- S2538. E- S2545. F- S2573. G- AP 03. H- AP 115. I- AP 117. J- AP 210. K- QST 713. L- Quartzo®. Setas vermelhas indicam o crescimento bacteriano. 75
- Figura 12 - Isolados de Bacillus que não apresentaram colonização in vitro de raízes. A- Testemunha. B- S2543. C- S2564. D- S2569 ..... 76
- Figura 13 - Efeitos in vivo de isolados de Bacillus na cultivar de algodão FM 975 WS aos 100 dias após sementeira desenvolvidas em substratos infestados com Meloidogyne incógnita raças 3 e 4. A – Diâmetro(mm). B – Altura (cm). C- Peso seco foliar (g). D- Peso fresco da raiz (g)..... 82
- Figura 14 - Efeitos in vivo de espécies de Bacillus sob o número de ovos de Meloidogyne incognita raça 3 e 4 na cultivar de algodão FM 975 WS, aos 100 dias..... '83
- Figura 15 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 85
- Figura 16 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) – B; índice SPAD – C; peso fresco e seco (g) da parte aérea – DF – e do sistema ..... 86
- Figura 17 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 87

- Figura 18 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; peso fresco e seco (g) da parte aérea – BC – e do sistema radicular – DE de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby<sup>®</sup>, 3- Quartzo<sup>®</sup>, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 .....88
- Figura 19 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby<sup>®</sup>, 3- Quartzo<sup>®</sup>, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 .....90
- Figura 20 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) – B; índice SPAD – C; peso fresco e seco (g) da parte aérea – DF – e do sistema radicular – EG de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby<sup>®</sup>, 3- Quartzo<sup>®</sup>, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 .....91
- Figura 21 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby<sup>®</sup>, 3- Quartzo<sup>®</sup>, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 .....92
- Figura 22 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; peso fresco e seco (g) da parte aérea – BC – e do sistema radicular – DE de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby<sup>®</sup>, 3- Quartzo<sup>®</sup>, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 .....93
- Figura 23 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides mas sem infestação de

Fusarium, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 95

Figura 24 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) - B; índice SPAD - C; peso fresco e seco (g) da parte aérea - DF - e do sistema radicular - E e número de ovos de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides e sem infestação de Fusarium, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 96

Figura 25 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides mas sem infestação de Fusarium, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 98

Figura 26 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; pesos frescos e secos (g) da parte aérea e do sistema radicular - BCD e número de ovos (E) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em inoculadas com nematoides, mas sem infestação com Fusarium, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 99

Figura 27 - Efeito de isolados de Bacillus sob a parte aérea e as raízes de plantas de algodão cultivar FM975WS, aos 60 dias após sementeira, cultivadas em solo com infestação de Fusarium e inoculação de nematoides. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 101

Figura 28 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) - B; no índice SPAD - C; nos pesos (g) frescos e secos da parte aérea (DF) e do sistema radicular (E) e no número de ovos (G) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e com inoculação de nematoides, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 102

Figura 29 - Efeito de isolados de Bacillus no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e com inoculação de nematoides, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2 Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 ..... 104

Figura 30 - Efeito de isolados de Bacillus na altura (cm) – A; nos pesos (g) frescos e secos da parte aérea (BD) e do sistema radicular (C) e no número de ovos (E) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com Fusarium e com inoculação de nematoides, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2 Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527 105



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de ácido indolacético – AIA; ácido cianídrico – HCN; assimilação de nitrogênio – AN; catalase – CAT; sideróforos SID e solubilização de fosfato - SP por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	55
Tabela 2 - Formação de halos de inibição por isolados de <i>Bacillus</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasunfectum</i> , in vitro .....	57
Tabela 3 - Inibição da germinação de esporos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> por <i>Bacillus</i> spp .....	59
Tabela 4 - Efeito da concentração e dos dias de multiplicação dos metabólitos de <i>Bacillus</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i> .....	60
Tabela 5 - Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 6501B2FR, aos 15 dias .....	65
Tabela 6 - Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7201B2FR, aos 15 dias .....	66
Tabela 7 - Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7501 WS, aos 15 dias.....	67
Tabela 8 - Efeito de metabólitos de <i>Bacillus</i> na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) a <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4, na concentração de 20% .....	77
Tabela 9 - Efeito de metabólitos de <i>Bacillus</i> na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) a <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4, na concentração de 16% .....	78
Tabela 10 - Porcentagem de eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> aos 7, 14, 21 e 28 dias, e área abaixo da curva de progresso da eclosão (AACPE) sob efeito de espécies de <i>Bacillus</i> spp.....	80



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1	A CULTURA DO ALGODÃO .....	25
2.2	MURCHA DE <i>FUSARIUM</i> DO ALGODOEIRO .....	26
2.3	<i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> EM ALGODOEIRO .....	27
2.4	CONTROLE DE <i>MELOIDOGYNE</i> E <i>FUSARIUM</i> .....	29
2.5	O GÊNERO <i>BACILLUS</i> .....	31
2.6	<i>BACILLUS</i> SPP. COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS .....	31
2.7	MECANISMOS DE AÇÃO DE <i>BACILLUS</i> SPP. ....	32
2.8	<i>BACILLUS</i> SPP. COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO .....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.1	OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> .....	38
3.2	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CIANÍDRICO, ÁCIDO INDOLACÉTICO, SIDERÓFOROS, CATALASE, SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO POR ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. ....	38
3.3	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>FUSARIUM OXYSPOURUM</i> F. SP. <i>VASINFECTUM</i> POR ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. ....	40
3.4	ESTUDO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>FUSARIUM</i> .....	41
3.5	AVALIACÃO DA PRODUÇÃO E TERMOESTABILIDADE DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS</i> SPP. <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>FOV</i> .....	41
3.6	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ALGODOEIRO POR <i>BACILLUS</i> SPP, <i>IN VIVO</i> .....	42
3.7	EFEITO DA APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. INDIVIDUALMENTE E EM MISTURA NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ALGODÃO EM RIZOTRONS .....	44
3.8	COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE ALGODÃO POR <i>BACILLUS</i> SPP.....	44
3.9	CONTROLE <i>IN VIVO</i> DA MURCHA DE <i>FUSARIUM</i> POR <i>BACILLUS</i> SPP., SOB CULTIVO PROTEGIDO .....	45
3.10	MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> RAÇAS 3 E 4.....	46

3.11	EFEITO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SOBRE A MORTALIDADE DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁGIO (J2) DE <i>M. INCOGNITA</i> RAÇA 3 E 4 <i>IN VITRO</i> .....	47
3.12	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> COM METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS TÓXICOS A <i>M. INCOGNITA</i> RAÇAS 3 E 4 <i>IN VITRO</i> .....	48
3.13	EFEITO DE <i>BACILLUS</i> SPP. SOBRE A ECLOSÃO DE JUVENIS DE <i>M. INCOGNITA</i> RAÇA 3 .....	48
3.14	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. ANTAGÔNICOS A <i>M. INCOGNITA</i> RAÇAS 3 E 4 <i>IN VIVO</i> .....	49
3.15	CONTROLE <i>IN VIVO</i> DO COMPLEXO <i>FUSARIUM</i> -NEMATOIDE POR <i>BACILLUS</i> SPP., SOB CULTIVO PROTEGIDO .....	50
3.16	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>BACILLUS</i> POR SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DO GENE 16S rRNA.....	52
4	RESULTADOS .....	55
4.1	PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO, ÁCIDO CIANÍDRICO, SIDERÓFOROS E CATALASE; SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO POR ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP.....	55
4.2	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>VASINFECTUM</i> POR ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> .....	56
4.3	ESTUDO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>FUSARIUM</i> .....	58
4.4	TERMOESTABILIDADE DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS</i> SPP. <i>IN VITRO</i> .	59
4.5	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ALGODOEIRO POR <i>BACILLUS</i> SPP. ....	64
4.5.1	Avaliação da promoção de crescimento após 15 dias da semeadura .....	64
4.6	EFEITO DA APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. INDIVIDUALMENTE E EM MISTURA NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ALGODÃO EM RIZOTRONS .....	71
4.7	COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE ALGODÃO POR <i>BACILLUS</i> SPP. ....	74
4.8	CONTROLE <i>IN VIVO</i> DA MURCHA DE <i>FUSARIUM</i> POR <i>BACILLUS</i> SPP. ....	76
4.9	EFEITO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SOBRE A MORTALIDADE DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁGIO (J2).....	76

4.10	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> COM METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS TÓXICOS A <i>M. INCOGNITA</i> RAÇAS 3 E 4, <i>IN VITRO</i> .....	78
4.11	EFEITO DE <i>BACILLUS</i> SPP. SOBRE A ECLOSÃO DE JUVENIS DE <i>M. INCOGNITA</i> RAÇA 3	78
4.12	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. ANTAGÔNICOS A <i>M. INCOGNITA</i> RAÇAS 3 E 4 <i>IN VIVO</i> .....	81
4.13	CONTROLE <i>IN VIVO</i> DO COMPLEXO <i>FUSARIUM</i> -NEMATOIDE POR <i>BACILLUS</i> SPP., SOB CULTIVO PROTEGIDO.....	83
4.14	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>BACILLUS</i> POR SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DO GENE 16S rRNA .....	106
5	DISCUSSÃO .....	108
6	CONCLUSÃO .....	114
	REFERÊNCIAS.....	115



## 1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é considerado mundialmente uma das mais importantes culturas de fibras. No mundo, são plantados cerca de 35 milhões de hectares ao ano (ABRAPA, 2021) resultando numa produção em torno de 26,5 milhões de toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2021).

Nos últimos anos houve aumento em produtividade da cultura em razão dos avanços genéticos e melhorias do sistema de produção, mas essa produtividade não é maior em razão da ocorrência de pragas e doenças que acometem a cultura.

As condições edafoclimáticas das regiões produtoras como altas temperaturas, veranicos, solos arenosos na sua maioria e a suscetibilidade das cultivares às doenças levaram ao aumento dos custos de controle. Essa situação resultou no aumento do uso dos insumos químicos com conseqüente aumento nos custos de produção (FREIRE, 2007; BORÉM; FREIRE, 2014).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 causam grandes perdas de produtividade e em alguns casos inviabilizam a produção (CIA; GALBIERI, 2016; XIANG et al., 2017; XIANG; LAWRENCE; DONALD, 2018) . Estes dois fitopatógenos podem ocorrer concomitantemente, formando o complexo *Fusarium*-nematóide (Fus-nem), com maior poder destrutivo comparado com a ocorrência isolada de ambos. Esses patógenos têm a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo, sem a presença de seu hospedeiro principal. Além disso, *M. incognita* possui uma ampla gama de hospedeiros, dificultando a adoção de métodos de controle eficientes a ambos os fitopatógenos.

O aumento de focos e de glebas infectadas tem gerado preocupação para produtores do setor. A preocupação é justificada devido ao alto potencial destrutivo desses patógenos, aliado à dificuldade em eliminá-los da área. Após a introdução é preciso conviver com estes fitopatógenos e reduzir os danos na cultura, principalmente, mediante o uso de cultivares resistentes e rotação de culturas. Entretanto, muitas cultivares de algodão, com alto desempenho agrônômico, não possuem resistência genética em níveis adequados. Além disso, a rotação de culturas também não é realizada por muitos produtores. Devido a esses aspectos está ocorrendo aumento do potencial de inóculo dos fitopatógenos ano após ano conduzindo ao maior uso de nematicidas e fungicidas para garantir altas produtividades. O uso desses produtos para o controle de fitopatógenos de solo

apresenta riscos de contaminação ambiental, deterioração da saúde dos trabalhadores rurais, seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos e elevação dos custos de produção (RAUT; DALVI; MANWAR, 2011), havendo necessidade de se encontrar alternativas economicamente mais vantajosas para o agricultor e menos agressivas ao meio ambiente.

O controle biológico tem sido apontado como um método seguro e uma alternativa sustentável para o manejo de patógenos de solo, apresentando vantagens em relação ao controle químico. Dentre os potenciais agentes de biocontrole, destaca-se uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito antagônico a fungos e nematoides (LIU et al., 2017; MACHADO et al., 2012; RAO et al., 2017; TIAN; YANG; ZHANG, 2007). As bactérias de maior destaque com potencial para controle biológico pertencem ao gênero *Bacillus*. *Bacillus* possuem a capacidade de sobreviver na rizosfera, colonizar as raízes das plantas e apresentam vários benefícios às culturas, tais como: promoção de crescimento de plantas, disponibilização de nutrientes e hormônios vegetais, proteção contra patógenos e indução de resistência a estresses bióticos e abióticos.

As perdas causadas por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita* em algodoeiro são preocupantes, sobretudo quando estes agem em interação, podendo atingir mais de 40% da produção. O controle dessas doenças é difícil e oneroso, sendo que em média são gastos US\$120 milhões anualmente, o que equivale em torno de 25% do custo de produção (COX et al., 2019; NCC, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de produtos à base de *Bacillus* têm um grande potencial de mercado e poderá colaborar com a constituição de empresas visando a disponibilização desses produtos no mercado brasileiro. Além disso, poderá disponibilizar aos agricultores uma tecnologia de menor impacto no ambiente.

Os objetivos do estudo foram selecionar e caracterizar isolados de *Bacillus* antagônicos a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*; avaliar o potencial de *Bacillus* spp. em controlar os dois patógenos inoculados simultaneamente, bem como selecionar isolados promotores de crescimento das plantas; e identificar os isolados de *Bacillus* selecionados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do algodão

A cultura do algodão é cultivada em todos os continentes, em mais de 80 países, sendo os principais produtores Índia, China, Estados Unidos, Brasil e Paquistão (ABRAPA, 2021). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de algodão, com área cultivada de 1,67 milhões de ha e produção de 1.802.000 toneladas, representando 10,6% da produção mundial (2019/2020) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2021). O Brasil se destaca como o segundo maior exportador mundial de algodão e possui a segunda melhor produtividade (1.802 kg/ha), perdendo apenas para a Austrália (2.268 kg/ha) onde a cultura é praticamente toda irrigada. Levando em consideração apenas o algodão produzido em sequeiro (sem utilização de sistemas de irrigação artificiais), o Brasil se destaca com a melhor média mundial de produtividade (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2021).

A cotonicultura brasileira está distribuída por 15 Estados, sendo Mato Grosso, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, os principais estados produtores. Porém, 89,9% do plantio se localiza em Mato Grosso e Bahia (ABRAPA, 2021).

O algodoeiro possui um ciclo diversificado com variedades de ciclo precoce (130 dias), médio (140 dias) e tardio (acima de 170 dias). Também apresenta variedades anuais, perenes e semiperenes. O algodão desenvolve-se bem em regiões de 180 a 200 dias livres de geadas, com temperatura média acima de 20°C, dias predominantemente ensolarados, precipitação pluviométrica de 500 a 1.500 mm anuais distribuída ao longo do ano (AMORIM et al., 2001).

A região Centro-Oeste do Brasil tem um clima bem definido como a estação da seca e da chuva com uma luminosidade constante sendo uma grande oportunidade para o cultivo do algodão, além de uma alternativa para a rotação de cultura com o milho e a soja (FONTES et al., 2006). O aumento de produção e de área plantada com a cultura na região, bem como com clima favorável, houve um aumento na intensidade das doenças e também o surgimento de novas doenças (CASSETARI NETO; MACHADO, 2005). As condições edafoclimáticas do Cerrado brasileiro, assim como o sistema de cultivo adotado nessa região, com extensas áreas e um número reduzido de variedades, aumenta a possibilidade de aparecimento de surtos epidêmicos (SUASSUNA; COUTINHO, 2015).

## 2.2 Murcha de Fusarium do algodoeiro

A produção da cultura do algodão é afetada por problemas fitossanitários que resultam em uma baixa produtividade e qualidade do algodão. Os fitopatógenos de solo são de grande importância para a cultura, pois causam perdas significativas na produtividade. O agente etiológico da fusariose do algodoeiro é o fungo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), que causa grandes danos a cultura e está presente em todas as regiões produtoras de algodão (ASSIGBETSE et al., 1994).

No Brasil, a fusariose do algodoeiro foi detectada, pela primeira vez, no estado da Paraíba, em 1935 (VEIGAS, 1935), tem sido disseminada para outros estados do país. Na década de 1970 atingiu o estado de São Paulo, que era o maior produtor da cultura algodoeira (CIA, 1977). Atualmente, há a ocorrência da doença em locais antes livres do patógeno (MACHADO et al., 2012).

O controle da doença se torna mais difícil e, muitas vezes, inviável quando o fungo está disseminado nas áreas. Isso se deve ao fato de *Fov* produzir estruturas que são resistentes e podem permanecer no solo por até 12 anos, mesmo sem a presença da cultura (SMITH; SNYDER, 1975). Esta característica do patógeno evidencia a necessidade de um alerta nas regiões produtoras do algodoeiro e destacando a importância de alternativas para evitar a entrada do patógeno nas áreas de plantio. Além do algodoeiro, espécies das famílias Leguminosae, Malvaceae e Solanaceae também sofrem danos consideráveis com o ataque desse fungo. Além da forma *specialis vasinfectum* ser patogênica para todas as variedades de algodão (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1978; ASSIGBETSE et al., 1994).

O *Fov* produz microconídios, unicelulares e formados a partir de fiálides curtas com falsas terminações (cabeças); macroconídios, levemente falcados com 3 a 5 septos; e clamidósporos, que são as estruturas de resistência do patógeno que permanecem no solo mesmo na ausência do hospedeiro (MATHUR; KONGSDAL, 2003). Seis raças de *Fov* foram identificadas até o momento, que diferenciam na patogenicidade e virulência às diferentes cultivares de algodão (DA SILVA et al., 2019). As raças são 1, 2, 4/7, 3/5, 6 e 8, sendo a raça 6 originária do Brasil (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1978).

A infecção por *Fov* ocorre com a penetração do fungo pelas raízes, radículas ou pêlos. Com a produção de metabólitos secundários produzidos pelo fungo dá início à

murcha, sintoma ocasionado pela ocorrência do fungo no hospedeiro. Após a infecção ocorre o surgimento dos sintomas. Esses podem estar presente em qualquer estágio de desenvolvimento do hospedeiro. Sintomas como turgescência e lesões irregulares amareladas e progredindo para necrose, são característicos em plantas adultas. O sintoma mais comum é o aparecimento de uma coloração marrom-avermelhada ao longo do xilema, que pode ser referente a produção de etileno e oxidação de fenóis (DAVIS et al., 2006; CIA, 1977). O patógeno produz o ácido fusárico nas culturas, como consequencia ocorre um desbalanço hídrico e a murcha (SMITH et al., 1981).

As condições do meio para um melhor desenvolvimento e aparecimento da fusariose estão relacionadas ao alto teor de areia, solos com pH ácido, fertilidade do solo e culturas susceptíveis. As temperaturas ideais para o patógeno são entre 25 a 31°C e alta umidade (CIA; GALBIERI, 2016). Além disso a presença de nematoides no solo pode potencializar a infecção do fungo no hospedeiro, tais como *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* (CIA et al., 2003; KOENNING et al., 2004).

### **2.3 *Meloidogyne incognita* em algodoeiro**

Para o algodoeiro em todo o mundo, nematoides são considerados grandes problemas devido à alta suscetibilidade da cultura a determinadas espécies (STARR, 1998). O nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, é o mais danoso das espécies de nematoides que atacam o algodoeiro, sobretudo em áreas de solos arenosos (GALBIERI et al., 2016). A espécie *M. incognita* apresenta quatro raças fisiológicas, das quais somente as raças 3 e 4 são capazes de se reproduzir em algodão (TAYLOR; SASSER, 1978).

No Brasil, *M. incognita*, além do algodoeiro, também é importante patógeno de várias plantas cultivadas (LORDELO, 1976), possuindo uma ampla gama de hospedeiros que abrange mais de 3.000 espécies de plantas (ABAD et al., 2003). Em determinadas condições, há relatos de perda de rendimento na ordem de 40-50% nas cultivares susceptíveis em áreas infestadas por esse patógeno (GALBIERI et al., 2011).

O nematoide das galhas é sedentário endoparasita e apresenta as fases de ovo, quatro estádios juvenis e adulto. A primeira ecdise ocorre ainda dentro do ovo e o juvenil de segundo estágio emerge do ovo. O J2 tem grande importância biológica,

pois é sua fase infectiva; normalmente é encontrado no solo ou nas massas de ovos produzidos pelas fêmeas. Os demais estádios juvenis e a fêmea adulta são encontrados nas raízes e são sedentários (GALBIERI; ASMUS, 2016).

A infecção da raiz pelo juvenil de segundo estágio se dá nas proximidades da região apical; em seguida, ocorre o caminhar pelo córtex a fim de atingir o estelo da raiz, onde inicia o parasitismo. Para tanto, incita a formação de células nutridoras, hipertrofiadas (gigantes), do tipo cenócito, em número de 4 a 8, de onde obtém alimento (STARR et al., 2007).

Desse modo, ocorre alterações celulares induzindo o aumento da divisão e multiplicação celular no córtex da raiz adjacente ao sítio de alimentação, na região do estelo, surgindo nas raízes laterais galhas (GALBIERI; ASMUS, 2016).

A fêmea adulta é obesa, com formato de pêra e, normalmente rompe o córtex radicular durante seu crescimento, ficando com a região posterior do corpo exposta na superfície da raiz. Os ovos são ovopositados na parte externa das raízes, envoltos por uma gelatina, a massa de ovos. A espécie *M. incognita* apresenta machos, porém se reproduz por partenogênese, sendo que cada fêmea ovoposita, em média, 400 ovos, podendo ovopositar de 200 a 1.000 ovos (BRIDGE, 1992).

Quando ocorre o parasitismo de *M. incognita*, plantas apresentam um menor porte com um menor desenvolvimento radicular, devido ao bloqueio da translocação de nutrientes e água, porém o principal prejuízo ocorre em razão das alterações metabólicas celulares (utilização das substâncias fotossintetizadas). Da forma que as plantas sofrem essas alterações, ocorre sintomas semelhantes aos de deficiência hídrica e nutricional (GALBIERI; ASMUS, 2016), e conseqüentemente, observa-se folhas com manchas amarelas em contraste com verde, conhecido como sintoma “carijó”.

O nematoide possui ciclo de vida de 28 dias, sofrendo grande influência da temperatura, a qual em valores ideais, de 25 a 30°C, pode alterar o desenvolvimento do nematoide, além disso, a textura do solo pode influenciar esse desenvolvimento, com preferência para solos arenosos (KOENNING et al., 2004).

Além de causar problema de forma isolada, *M. incognita* torna-se mais importante quando associado à murcha de *Fusarium*. Além de provocar ferimento servindo de porta de entrada para o fungo, também predispõem a planta para a infecção de *Fusarium*. Essa interação é designada de complexo Fus-Nem (*Fusarium* x nematoide) (STARR et al., 2002).

Alternativas de manejo incluem a rotação de culturas, enriquecimento do solo com compostos orgânicos e uso de microrganismos biocontroladores de nematoides, principalmente fungos e bactérias (LAMOVSĚK; UREK; TRDAN, 2013), incluindo as rizobactérias.

Os estádios dos nematoides parasitas de plantas mais adequados para serem manejados com controle biológico são o ovo e os juvenis de segundo estágio (MACHADO et al., 2016). Esses estádios de vida se encontram fora dos hospedeiros, na película de água das partículas do solo, o que permite que os antagonistas tenham a oportunidade de entrar em contato, infectar e parasitar os nematoides. Dessa maneira, resultará na redução da densidade populacional e um manejo bem-sucedido.

Doze espécies de *Bacillus* foram relatadas para o manejo de *M. incognita*, incluindo *B. amyloliquefaciens* (BURKETT-CADENA et al., 2008), *B. circulans*, *B. coagulans* (SERFOJI; RAJESHKUMAR; SELVARAJ, 2010), *B. firmus* (MENDOZA; KIEWNICK; SIKORA, 2008; TEREFE; TEFERA; SAKHUJA, 2009), *B. licheniformis* (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1992), *B. megaterium* (KLOEPPER et al., 1992), *B. polymyxa* (KHAN; KOUNSAR; HAMID, 2002), *B. sphaericus* (KRECHEL et al., 2002), *B. subtilis* (KAVITHA; JONATHAN; UMAMAHESWARI, 2007) e *B. thuringiensis* (MOHAMMED et al., 2008).

A resistência sistêmica induzida (ISR) por algumas cepas de *Bacillus* também já foi relatada. Sikora (1988) observou que *B. subtilis* induziu proteção contra *M. incognita* no algodão. Cepas específicas de *B. velezensis*, *B. mycooides*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* e *B. subtilis* podem provocar reduções significativas na incidência de doenças em vários hospedeiros através da ISR (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004).

#### **2.4 Controle de *Meloidogyne* e *Fusarium***

Esses patógenos têm ampla gama de hospedeiros e capacidade de sobreviverem por longos períodos no solo sem a presença de seu hospedeiro, dificultando a adoção de métodos de controle eficientes (MATHUR; KONGSDAL, 2003; STARR et al., 2002).

A resistência é considerada a principal estratégia de controle de doenças de plantas, devido à facilidade de utilização e ao baixo custo empregado na sua utilização (AMORIM et al., 2011). Até o momento, este método não se aplica para um controle

satisfatório da murcha de *Fusarium* do algodoeiro, em razão dessa resistência ser 'quebrada' quando, além do fungo, existe também a presença de nematoides na área cultivada. Assim há necessidade de se incorporar genes de resistência aos nematoides das galhas e reniforme nas cultivares resistentes a *Fov* (DAVIS et al., 2006). Testes em campos infestados com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*, indicaram que cultivares que apresentavam alto nível de resistência ao nematoide tiveram melhor desempenho na redução de perdas quando comparadas às cultivares que possuíam apenas a tolerância ao *M. incognita* associada à moderada resistência à murcha de *Fusarium* (HYER et al., 1974). Muitas vezes, a estratégia de selecionar genótipos resistentes ao nematoide das galhas pode conferir, indiretamente, resistência ao complexo *Fusarium-Meloidogyne* (HILLOCKS, 1992).

O controle cultural tem como objetivo minimizar os efeitos negativos que as doenças podem causar sobre a produção de plantas cultivadas. Esse método de controle baseia-se em práticas de rotação de culturas, eliminação de hospedeiros alternativos, plantas voluntárias e restos culturais, incorporação de matéria orgânica, época de plantio, preparo de solo, densidade de plantio, controle de irrigação e drenagem, nutrição mineral e pH do solo. As práticas utilizadas no controle cultural em sua maioria buscam exercer interferência na sobrevivência, na produção e na disseminação do inóculo do patógeno (AMORIM et al., 2011).

O controle químico de doenças de plantas é uma alternativa para garantir altas produtividades e qualidade de produção. Cultivares de plantas, interessantes pelo bom desempenho agrônomo e pela preferência dos consumidores, geralmente aliam certa vulnerabilidade a agentes fitopatogênicos. Desta forma, sucessivas aplicações de produtos químicos sistêmicos e/ou de contato são utilizadas na cultura do algodão. Este fato, pode elevar os custos de produção, devido ao volume de agrotóxicos utilizados e aos altos preços desses produtos. Além disso, riscos ambientais e sociais como contaminação ambiental e riscos à saúde do produtor rural podem ser potencializados, uma vez que, tratam-se de produtos de elevada toxicidade e quando utilizados, os cuidados durante esse uso devem ser rigorosamente acompanhados (FERRAZ et al., 2010). Nesse contexto, a necessidade de se encontrar alternativas economicamente mais vantajosas para o produtor e menos agressivas ao meio ambiente torna-se uma realidade.

## 2.5 O gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* pertencem a família *Bacillaceae*, são Gram positivos, representando a heterogeneidade da sua espécie. São caracterizados como aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, crescem em várias fontes de carbono, possuem células em formato de bastonetes, de tamanho entre 0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm, produzem esporulação quando as condições não são favoráveis, de motilidade variável, podem formar biofilme, aglomeram-se em colônias de diferentes tipos morfológicos e habitam diversos nichos (solo, plantas e água) (EARL; LOSICK; KOLTER, 2008).

Em condições desfavoráveis e adversas de umidade e temperatura, os *Bacillus* produzem endósporos, estruturas de resistência, as quais podem permanecer no solo por muitos anos até o restabelecimento das condições favoráveis (MADIGAN et al., 2016). Segundo Euzéby (1997), atualmente esse gênero possui 336 espécies, encontradas em diversos ambientes e apresentam boa capacidade adaptativa, sobrevivendo a grandes variações de temperatura, osmolaridade e disponibilidade de fontes de carbono (LANNA-FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

## 2.6 *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole de doenças de plantas

Diversas são as ações biológicas de espécies de *Bacillus*: recicladoras de matéria orgânica, não patogênicas a mamíferos, endofíticas em vegetais, promotoras de crescimento de plantas e inibidoras de fitopatógenos (EARL; LOSICK; KOLTER, 2008; MARTINS et al., 2015). O biocontrole de fitopatógenos por meio da utilização de espécies e isolados de *Bacillus* é uma das mais promissoras tecnologias na área, pois esta bactéria, apresenta versatilidade de vários aspectos biológicos quando comparados a outros agentes de biocontrole.

Um dos pontos abordados no controle biológico de doenças de plantas com o uso de *Bacillus* spp. é que as plantas ao longo dos tempos desenvolveram um aprimorado mecanismo de defesa e convívio contra estresses abióticos e bióticos; sendo capaz de ser adquirido ou induzido, deste modo, os compostos secundários, conhecidos por metabólitos, estão envolvidos em interações de plantas com os agentes de biocontrole (YRUELA, 2015).

*Bacillus* spp. tem o potencial de produzir metabólitos pertencentes aos grupos da fengicina, iturina e surfactina (ONGENA; JACQUES, 2008), colonizar o sistema radicular, induzir resistência sistêmica do hospedeiro, produzir enzimas degradadoras da parede celular e de formar esporos resistentes, além de serem ativos contra inúmeros patógenos. Associado a isso, possuem mecanismos para induzir o crescimento de plantas como, fixação de nitrogênio, solubilização de formas minerais de fosfato, secreção de hormônios vegetais, produção de sideróforos e formação de biofilme (CAWOY et al., 2015).

Algumas espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methilotrophicus*, *B. velezensis* e *B. mojavensis* e outras são reconhecidamente agentes de biocontrole (CAWOY et al., 2009; KULIMUSHI et al., 2018; LIU et al., 2017; ONGENA; JACQUES, 2008; PAZ et al., 2018; XIANG et al., 2017; YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018). O potencial de *B. subtilis* para o controle de doenças é descrito para o controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) (BETTIOL et al., 1994; BETTIOL; VARZEA, 1992; HADDAD et al., 2009), ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*) (BAKER; RAMSDELL; GILLET, 1985; YUEN et al., 2001; BETTIOL et al., 1992), ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (DORIGHELLO et al., 2015), damping-off (*Rhizoctonia solani*) (PENG et al., 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (KAMAL et al., 2016), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (LEÃO et al., 2016), *Ralstonia solanacearum* (WU et al., 2017), *F. oxysporum* (XU et al., 2014) e *Meloidogyne* spp. (MACHADO et al., 2012) entre outros. Essas espécies são inclusive base de biofungicidas registrados no mercado brasileiro, como Furatrop<sup>®</sup>, Bio Imune<sup>®</sup>, Serenade<sup>®</sup>, Sonata<sup>®</sup>, Quartzo<sup>®</sup>, Presence<sup>®</sup>, Nemacontrol<sup>®</sup>, Rizos<sup>®</sup>, Onix<sup>®</sup>, Duravel<sup>®</sup> e outros (AGROFIT, 2021), para o controle de diversos fitopatógenos.

Além da característica de controlar fitopatógenos e promover o crescimento de plantas, diversas espécies de *Bacillus* são esporulantes, o que facilita a obtenção de formulações comerciais com um maior período de vida de prateleira, apresentando resistências às condições adversas (CAWOY et al., 2015).

## **2.7 Mecanismos de ação de *Bacillus* spp.**

As principais razões pelo crescimento da utilização de *Bacillus* spp. estão ligadas a sustentabilidade do sistema, visto que o controle biológico tem como premissa o uso de um organismo vivo para o controle de outro organismo danoso às culturas agrícolas. Dessa forma, gera menor impacto ao meio ambiente; exigências do mercado consumidor por alimentos mais saudáveis. Outros aspectos importantes para o aumento do uso dos bioprotetores são a perda de eficiência de produtos químicos em razão da resistência dos fitopatógenos; a falta de novas moléculas químicas para utilização no manejo fitossanitário; a intensificação de pesquisas com melhoria da qualidade nas formulações e eficiência dos agentes biológicos e, ainda, a entrada de empresas tradicionais na área de químicos com grandes investimentos alavancando o crescimento do setor de biológicos.

Espécies de *Bacillus* são aplicadas para o controle de patógenos de plantas onde atuam por meio de diversos mecanismos de ação. Alguns interagem com as plantas por indução de resistência, sem qualquer interação direta com o patógeno alvo. Outras espécies atuam por meio da competição por nutrientes ou outros fatores que restringem as condições de crescimento do agente patogênico; da antibiose que interfere diretamente com o patógeno, e promoção de crescimento de plantas (CONRATH et al., 2015).

A indução de resistência é a capacidade de organismo ou agente químico provocar resposta de defesa no hospedeiro por meio de reações químicas ou bioquímicas, incluindo alterações na estrutura dos tecidos e na produção de proteínas relacionadas com patogênese, expresso localmente ou sistemicamente. Quando *Bacillus* spp. colonizam o sistema radicular, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizada e liberadas para o ambiente, atuam como eliciadoras de sinais bioquímicos, provavelmente os jasminatos e etileno (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). Dessa maneira, não há pressão de seleção sobre o agente patogênico por meio da resistência induzida por *Bacillus* spp. ou por compostos de sinalização porque esses não interagem diretamente com o agente patogênico.

A competição por espaço e fontes de carbono é um dos principais mecanismos dessas bactérias contra os fitopatógenos. A capacidade da bactéria colonizar depende da adaptação em assimilar as fontes de carbono necessárias para sua sobrevivência, multiplicação, limitando assim os carboidratos disponíveis para os fitopatógenos, reduzindo o percentual da germinação de esporos, e assim, a capacidade do patógeno invadir o hospedeiro (SPADARO; DROBY, 2016). Desse modo, as espécies

de *Bacillus* com potencial competitivo, devem ser capazes de ocupar tais nichos, para sobreviver e para consumir fontes rapidamente essenciais de nutrientes, como açúcares e exsudatos de plantas nas superfícies e em resíduos de plantas, de modo que os patógenos sem competitividade não sejam capazes de infectar o hospedeiro.

A produção de sideróforos por agentes de controle biológico pode ser considerada um mecanismo de competição no controle de patógenos. O ferro é um elemento essencial para o crescimento de microrganismos. As espécies de *Bacillus* podem produzir sideróforos, pequenas moléculas peptídicas que possuem cadeias laterais e grupos funcionais, os quais promovem afinidade com íons ferro. Quando a bactéria produz sideróforo em um meio limita a germinação de esporo e o crescimento micelial do patógeno. Dessa maneira, a produção de sideróforos confere aos *Bacillus* spp. características competitivas. Foi demonstrado que a competição por ferro resultou em reduzidas populações de patógenos nas rizosferas (RAAIJMAKERS et al., 1995). Além disso, os sideróforos produzidos por bactérias competidoras de ferro tais como DAPG (2,4-diacetil-floroglucinol) e piocianina, biosurfactantes e compostos orgânicos voláteis, tais como 2R, 3R-butanodiol produzido por *B. subtilis* GB03 (130) e um álcool C13 voláteis emitidos de *Paenibacillus polymyxa* podem também agir como eliciadores induzindo a resistência sistêmica da planta (PIETERSE et al., 2014). Assim, a eficiência de *Bacillus* spp. dependem fortemente de suas competências ecológicas, metabolismo, crescimento e são essenciais para colonização do nicho e esgotamento dos nutrientes. O risco de desenvolvimento de resistência contra a concorrência por patógenos pode ser considerado como muito baixo, pois não há interação direta com o fitopatógeno (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

O parasitismo ocorre quando o antagonista se alimenta do fitopatógeno, produzindo lise parcial ou total de suas estruturas. As bactérias se alimentam das paredes celulares dos fungos, principalmente em quitina, glucanos e proteínas. O principal mecanismo de parasitismo é a excreção de enzimas degradadoras da parede celular combinados com a excreção de metabólitos secundários em contato com a célula hospedeira, levando a abertura na parede celular e subsequente desorganização do citoplasma (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). A degradação da parede celular é causada por uma gama de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases, ou no caso de oomicota, celulases. Essas enzimas degradadoras de parede celular podem ser produzidas por *Bacillus* spp. e são proteínas complexas constituídas por 100 ou 1000 aminoácidos com função de

catalisar a conversão de substratos específicos em produtos específicos (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

Timmusk et al. (2005) observaram a colonização das raízes das plantas por *P. polymyxa* formando estruturas que se parecem com biofilmes, protegendo as raízes contra doenças causadas por fitopatógenos. Outro exemplo é o da linhagem CHA0 de *Pseudomonas fluorescens*, com uma capacidade aprimorada de colonizar raízes de cenoura. Outro estudo indicou que uma cepa de *B. subtilis* (ATCC6051) pode formar estruturas do tipo biofilme nas raízes das plantas de *Arabidopsis* e, assim, proteger da infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae* (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004).

Membros do gênero *Bacillus* são consideradas fábricas microbianas para a produção de uma grande variedade de moléculas com potencial de inibição de crescimento de fitopatógenos, os metabólitos secundários (EMMERT; HANDELSMAN, 1999). Metabólitos antimicrobianos protegidos por este gênero são lipopeptídeos pertencentes a grupos heterogêneos de compostos orgânicos de baixo peso molecular produzidos por microrganismos, que são prejudiciais ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros microrganismos (THOMASHOW et al., 1990). Os metabólitos produzidos são considerados como o mecanismo de ação mais potente dos *Bacillus* spp. contra os concorrentes, e os lipopeptídeos mais estudados desse gênero pertencem as famílias das iturinas, surfactinas e fengicinas (ONGENA; JACQUES, 2008). *Bacillus subtilis* possui, em média, de 4-5% do seu genoma devoto a síntese de antibióticos e com potencial de produzir mais de 24 compostos antimicrobianos (STEIN, 2005).

Estudos evidenciam que os metabólitos desempenham um papel importante nas interações microbianas no solo e nas superfícies das plantas. Além disso, esses antibióticos em baixas concentrações podem estar envolvidos na sinalização e interação com a comunidade microbiana, comunicação com plantas e regulação da formação de biofilme (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

Os lipopeptídeos de *Bacillus* spp. estão envolvidos na fixação superficial de células bacterianas e formação de biofilme, ativando cascatas de sinalização, resultando na formação de matrizes que protegem os microrganismos de estresses ambientais adversos. Outros lipopeptídeos apoiam a mobilidade de bactérias, provavelmente por meio da alteração da viscosidade das superfícies colonizadas. Os antibióticos de superfície permitem que as bactérias se desloquem para locais ricos em nutrientes e também alterem a dinâmica da água nas superfícies foliares, o que

indiretamente afeta o desenvolvimento dos patógenos (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). E outros, ainda influenciam o estado nutricional das plantas.

Os mecanismos de ação de *Bacillus* spp. que serão expressos dependem das condições de crescimento nas plantas, a fisiologia da planta, a genética da cultivar escolhida e as condições para a germinação e infecção do patógeno.

## **2.8 *Bacillus* spp. como promotor de crescimento**

*Bacillus* sp. podem transformar as formas indisponíveis de nitrogênio e fósforo em formas disponíveis para serem absorvidas pelas raízes das plantas. Existem vários relatos de espécies de *Bacillus* solubilizando fosfato (TORRES; SANCLEMENTE, 2014). Desse modo, o fósforo que está no solo, porém não está disponível para as plantas, torna-se disponível e são absorvidos pelas raízes, tornando-se importante para o desenvolvimento das plantas. Além disso, possuem habilidade de produzir auxinas como o ácido indolacético (AIA), giberilina e citocinina, promovendo o crescimento radicular e da parte aérea (LANNA-FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Os microrganismos podem assimilar nitrogênio, disponibilizando-o para as plantas e, também, podem solubilizar o fosfato mediante secreção de ácidos ou enzimas como fosfatase, tornando-o disponível (JHA; SARAF, 2015). Segundo Kang et al., (2014) foi observado que a aplicação de espécies de *Bacillus* aumentaram o comprimento de raiz e da parte aérea bem como o peso fresco de plantas de mostarda. Ao mesmo tempo, foi verificado que plantas inoculadas com *Bacillus* apresentaram altos teores de clorofila, frutose, glucose e sucrose comparadas a plantas não inoculadas. Espécies de *Bacillus* solubilizaram fósforo e melhoraram o crescimento de plantas de banana (MATOS et al., 2017). Do mesmo modo, Sozer Bahadir et al. (2018), verificaram que os seis melhores isolados de *Bacillus* solubilizadores de fosfato também produziram um alto teor de ácido indolacético, um hormônio de crescimento que promove o alongamento celular. Dessa maneira, as espécies de *Bacillus* aumentaram o comprimento radicular e da parte aérea, melhorando o crescimento e desenvolvimento das plantas.

*Bacillus* sp. podem ser utilizadas para superar e regular os estresses abióticos como dessecação, calor, salinidade, seca e frio. Plantas de milho inoculadas com *B.*

*amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* e *B. subtilis* exibiram resposta fisiológica que aliviaram os efeitos negativos do estresse hídrico. A inoculação com essas espécies aumentou a biomassa da planta, o conteúdo relativo de água, o potencial de água na folha e diminuiu a perda de água, além de reduzir a atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase, catalase e glutathione peroxidase. Desse modo, o efeito de *Bacillus* spp. na osmorregulação aumentou a prolina, açúcares, aminoácidos livres e diminuiu o vazamento de eletrólitos (VARDHARAJULA et al., 2011).

Tiwari et al. (2017) relataram o papel de *B. amyloliquefaciens* (cepa SN13) sobre estresses abióticos como dessecação, calor, salinidade, seca, congelamento e frio em arroz cv. Saryu 52 sob condições hidropônicas. Em outro estudo, a cepa de *B. subtilis* FZR24, registrada como agente de controle biológico, foi testada em campo como tolerante ao sal em duas cultivares de pimenta e berinjela em solo salino (YAO et al., 2006). A irrigação de ambas as cultivares foi feita por água subterrânea salina. O uso da cepa de *Bacillus* FZB24 resultou em aumento de produtividade nas cultivares de pimenta e berinjela.

Algumas espécies de *Bacillus* podem ser produtoras de sideróforos, e assim, capazes de sequestrar o ferro disponível no solo, além de reduzir a forma férrica em forma ferrosa, que pode facilmente entrar no sistema radicular sendo uma característica essencial para bactérias competidoras (DERTZ; STINTZI; RAYMOND, 2006).

Produção de hormônios vegetais por *Bacillus* spp., como auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido abscísico é reportada (LANNA-FILHO; FERRO; PINHO, 2010). O ácido indolacético (AIA) bacteriano interfere diretamente na expansão radicular, proporcionando maior acesso aos nutrientes. Além disso, as auxinas também estão associadas às respostas de defesa da planta, pois atuam como sinalizadoras afetando a expressão de microrganismos fitopatogênicos.

O potencial do isolado *Bacillus* sp. PU-7 como bioinoculante nas lavouras de algodão foi relatado por Pindi (2014). As plantas inoculadas apresentaram crescimento superior às não inoculadas, em oito cultivares de algodão. Além disso, essas plantas exibiram altos níveis de produção de fitohormônios e análises bioquímicas, apresentando elevados níveis de AIA, proteínas, açúcares, clorofila e prolina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades abaixo foram realizadas nas dependências no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini”, pertencente à Embrapa Meio Ambiente, situada no município de Jaguariúna, SP, na Embrapa Cenargen, situada em Brasília, DF e no Laboratório de Nematologia da UNESP/FCAV, situado em Jaboticabal, SP.

#### 3.1 Obtenção de isolados de *Bacillus*

Trinta e cinco isolados de *Bacillus* spp., obtidos da rizosfera de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) coletadas nas cidades de Lucas do Rio Verde e Sorriso, no estado do Mato Grosso, e pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram utilizados. Além desses, também foram utilizados os isolados AP 03, AP 61, AP 115, AP 117 e AP 210 obtidos por Bettiol, 1988 e o produto comercial Serenade® à base de *Bacillus subtilis* QST 713, totalizando 41 isolados de *Bacillus*. Os isolados foram reativados em meio de cultura TSB (caldo de triptona de soja) por 72h e após esse tempo a pureza das bactérias foi verificada, conforme metodologia adaptada de MONNERAT et al. (2007).

O isolado patogênico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 007, foi cedido pela Embrapa Algodão e reativado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

#### 3.2 Produção de ácido cianídrico, ácido indolacético, sideróforos, catalase, solubilização de fosfato e assimilação de nitrogênio por isolados de *Bacillus* spp.

A produção de ácido cianídrico (HCN) foi avaliada pelo método adaptado de Bakker; Schippers (1987). Os 41 isolados foram multiplicados em meio Trypticase Soy Agar (TSA) por 96 horas a  $28 \pm 2$  °C, e discos de 5 mm contendo *Bacillus* foram retirados e inoculados em placas de Petri previamente preenchidas com TSA modificado (4 g de TSA e 15 g de ágar por litro de água destilada). Na tampa destas placas foi colocado um disco de papel de filtro embebido com a solução de ácido pícrico (0,5% v/v) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,0% p/v) sem contato com o meio de cultura. As placas

foram mantidas a  $28 \pm 2$  °C por 24 horas. A produção de HCN foi indicada pela mudança de tonalidade do papel (branco para amarelo ou marrom-alaranjado).

Para avaliar a produção de ácido indolacético (AIA), os isolados foram multiplicados em TSA acrescido de  $1,021 \text{ g L}^{-1}$  de L-triptofano, precursor do AIA, a  $28 \pm 2$  °C por 24 horas. Após este tempo, foi colocada uma membrana de nitrocelulose autoclavada sobre o crescimento de cada isolado e colocado 1 mL de Salkowski (1 mL de solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em 50 mL de  $\text{HClO}_4$  35,0%) por placa. A mudança da coloração da membrana de branco para rosado indica os isolados produtores de AIA (BRIC et al., 1991; GORDON; WEBER, 1951).

Para avaliar a produção de sideróforos, 100 µl de suspensão de crescimento de *Bacillus* multiplicado em TSB a  $28 \pm 2$  °C foram transferidos para meio líquido KB (20 g de proteose peptona nº3; 1,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 15 mL de glicerol e 1.000 mL de água destilada), em Erlenmeyer mantidos em mesa agitadora, na temperatura de  $28 \pm 2$ °C por sete dias. Em seguida, 1 mL deste crescimento foi centrifugado durante cinco minutos a aproximadamente 9.500 rpm (DOBEREINER et al., 1995). Após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante de cada cultura foram adicionados a poços de microplacas juntamente com 100 µl do reagente Cromo Azurol. Os isolados que apresentarem a coloração alaranjada ou amarelada foram considerados produtores de sideróforos (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

A catalase foi determinada adicionando 500 µl de peróxido de hidrogênio e 100 µl de suspensão de crescimento de *Bacillus*, previamente crescido  $28 \pm 2$  °C em TSB. Com a formação de bolhas o isolado foi considerado catalase positivo (ROMEIRO, 2001; MARINGONI, 2010).

A solubilização de fosfato foi avaliada transferindo um disco de 5 mm dos isolados multiplicados em meio TSA para o meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999) composto de 10 g de glicose, 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g de KCl, 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  e 15 g de ágar por 1.000 mL de água destilada e posterior incubação a  $28 \pm 2$  °C por sete dias. A formação de halo transparente no meio de cultura, em torno dos discos indica que o isolado solubiliza fosfato (DORIGHELLO, 2017).

Para avaliar a assimilação de nitrogênio, 100 µl de suspensão de crescimento de *Bacillus*, previamente multiplicado em TSB a  $28 \pm 2$  °C, foram transferidos em vidros de penicilina preenchidos com NFB autoclavado [5 g de ácido málico, 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de NaCl, 0,002 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mL de

solução de micronutrientes (0,04 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 1,175 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  com o acréscimo de 1.000 mL de água destilada), 2 mL de azul de bromotimol (solução de 0,5% em 0,2N KOH); 4 mL de FeEDTA (solução 1,64%), 1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina, 20 mg de piridoxol- HCl dissolvidos em banho-maria e com o complemento com água destilada até completar o volume de 100 mL de solução) e 4,5 g de KOH] com pH ajustado para 6,5 – 6,8 com a adição de NaOH (DOBEREINER et al., 1995; QUECINE, 2010). Os vidros foram incubados em BOD por sete dias a  $28 \pm 2$  °C e avaliados de acordo com a metodologia proposta por Quecine (2010) com a identificação dos isolados assimiladores de nitrogênio pelo crescimento no terço médio e inferior do meio de cultura, com mudança de coloração de verde para azul.

Foram realizadas três repetições para cada um dos 41 isolados para cada teste descrito acima.

### **3.3 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por isolados de *Bacillus* spp.**

Os 41 isolados de *Bacillus* spp. foram avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (007). Todos os isolados de *Bacillus* foram cultivadas em meio de cultura TSA (Tryptona Soja Agar), por 48 horas, a 28 °C, no escuro. O fungo foi crescido em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), à  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. O antagonismo *in vitro* foi analisado mediante confronto direto, com a adoção do método de pareamento de culturas em placas de Petri. Um disco de 5 mm de diâmetro contendo estrutura fúngica do patógeno e um dos isolados de *Bacillus* foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, mantendo a distância de 7 cm entre eles. As placas foram incubadas nas mesmas condições descritas para o crescimento do fungo. Como controle, foi inoculado apenas o patógeno na placa. Para cada tratamento foram feitas três repetições. O diâmetro das colônias e os halos de inibição foram avaliados diariamente. Após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk,  $P=0,05$ ) foi realizada análise de variância. As médias dos halos foram comparados a 5% (Scott-Knott) utilizando o software R 3.2.3.

### **3.4 Estudo da inibição da germinação de esporos de *Fusarium***

Para avaliar o efeito dos isolados de *Bacillus* na germinação de esporos de *Fov*, os isolados foram multiplicados em meio de cultura GPL (10g de peptona; 10g de glicose; 5g de extrato de levedura; 3 g de NaCl; 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 1000 ml de água destilada e pH 6,0), sob agitação constante a 180 rpm a 28°C no escuro por 48 horas. A concentração dos isolados foi ajustada para 10<sup>8</sup> UFC/ml. A suspensão de esporos do isolado *Fov* foi obtida de placas de Petri provenientes de colônias com sete dias de cultivo em meio de cultura BDA. Foram adicionados 10 ml de água esterilizada autoclavada nas placas de Petri contendo o patógeno, e raspadas com uma espátula para se obter uma suspensão de 10<sup>6</sup> esporos/ml. Após esse processo, foi preparado a mistura destas suspensões com a adição de 10 µl de cada uma, sob lâminas de vidro. As lâminas foram acondicionadas no interior de placas de Petri contendo de papel toalha umedecido e essas placas acondicionadas em bandejas com espuma umedecida no fundo. Foram realizadas três repetições para cada isolado. As placas foram incubadas em BOD por 24 h, e após este período foram analisados 100 esporos por lâmina e contados o número de esporos germinados e não germinados, calculando a porcentagem de inibição (número de esporos não germinados) em relação a testemunha (água).

### **3.5 Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. *in vitro* contra *Fov***

Para testar a produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos *in vitro*, foram utilizados nove isolados de *Bacillus*, selecionados entre o teste de inibição do crescimento micelial e o estudo da inibição da germinação de esporos de *Fusarium*.

As colônias das bactérias foram transferidas para Erlenmeyers de 250 ml, contendo 100 ml de meio GPL. Durante a incubação (28 °C) no escuro, sob agitação constante, diariamente foram coletadas aliquotas de 5 e 10 ml de cada caldo fermentado, até o quinto dia, e transferidas para Erlenmeyers, contendo 95 e 90 ml de BDA, e posteriormente esterilizados em autoclave por 20 min, a 120 °C. Após homogeneização da suspensão, foram depositados 20 ml por placas de Petri. A partir do meio solidificado, foi transferido para o centro de cada placa um disco de 5 mm de

diâmetro contendo estrutura de Fov, com sete dias de idade. As testemunhas foram constituídas de placas contendo o patógeno nos meios, sem a presença dos metabólitos. O diâmetro da colônia de Fov foi avaliado diariamente até o sétimo dia de incubação. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições, e cada placa de Petri foi considerada uma unidade experimental. Foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial, segundo a equação:

$$IVCM = \sum \left( \frac{D - D_a}{N} \right) \quad (1)$$

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

A análise de variância foi realizada após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias comparadas por Scott-Knott a 5% de significância, determinando o melhor período para eficiência do metabólito termoestável ao Fov.

### 3.6 Promoção de crescimento de algodoeiro por *Bacillus* spp, *in vivo*

Os 41 isolados de *Bacillus* foram previamente multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura TSA por 48 horas. Após esse período, 10 ml de solução salina 0,85% estéril foram adicionados em cada placa, e as colônias raspadas com uma espátula autoclavada para obter uma suspensão bacteriana. Para cada isolado foram necessárias cinco placas de Petri. As suspensões bacterianas foram recolhidas em um Becker e a concentração ajustada em espectrofotômetro para  $10^8$  UFC/ml, utilizando 550 nm e 0,2 de absorbância. Após o ajuste, as sementes de algodão foram adicionadas nas suspensões bacterianas onde permaneceram por uma hora. Após essa etapa, as sementes permaneceram em repouso para secagem em temperatura ambiente e foram semeadas em vasos na casa de vegetação.

O ensaio foi conduzido em vasos de 0,5 litro, preenchidos com solo e foram semeadas sete sementes por vaso. Após o desbaste foram mantidas cinco plântulas em cada vaso, sendo cada unidade amostral, um vaso com cinco plantas de algodão.

Como testemunhas, foram utilizadas sementes tratadas apenas com solução salina 0,85% estéril e o produto comercial a base de *B. subtilis* QST 713 (Serenade®), seguindo recomendações do fabricante. Cada tratamento foi composto por cinco blocos ao acaso e todos os isolados foram testados em três cultivares de algodão (IMA 6501B2FR, IMA 7501 WS e IMA 7201 B2FR).

Após 15 dias da semeadura, foram avaliados o teor de clorofila na folha de duas plantas em cada tratamento, com auxílio do aparelho SPAD 502 Plus (Ninolta). Além disso, nas cinco plantas de cada tratamento foram avaliadas altura da parte aérea, comprimento de raiz, peso fresco e seco da parte aérea e da raiz. Os resultados foram avaliados utilizando-se software R 3.2.3. A normalidade dos dados foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk ( $P = 0,05$ ), após realização da análise de variância, as médias foram comparadas por Tukey a 5% de significância.

Com os isolados de *Bacillus* selecionados no ensaio anteriormente descrito, na caracterização bioquímica e nos testes *in vitro* de inibição da germinação e crescimento micelial de Fov, foi realizado outro ensaio de promoção de crescimento. Os isolados foram pré-cultivados em meio de cultura GPL, por 48 horas em frascos, sob agitação constante a 180 rpm à 28 °C no escuro. Após essa etapa, 10% de cada suspensão bacteriana foi transferida para novo Erlenmeyer contendo meio de cultura GPL, permanecendo novamente sob agitação constante a 180 rpm à 28 °C no escuro por 4 dias. Foi realizada a microbiolização das sementes de algodão, mediante imersão das sementes nas culturas de bactérias (concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL) por uma hora, sob agitação. As sementes foram deixadas para secar em temperatura ambiente durante uma hora. Foram semeadas cinco sementes e, após desbaste, mantida uma planta por vaso de 4,5 litros, preenchidos com solo. A irrigação dos vasos foi realizada diariamente e, a cada 15 dias realizada aplicações de inseticidas. A cada 15 dias foi avaliada a altura de cada planta, o diâmetro do caule no colo da planta e a área foliar, mediante equação  $Y = 0,4322 X^{2,3002}$ , proposta por Grimes, Carter (1969), onde  $Y =$  área foliar  $^{-1}$ ;  $X$  - comprimento da nervura principal da folha do algodoeiro. Decorridos 80 dias foram avaliados comprimento de raiz, altura das plantas, peso fresco e seco da parte aérea e da raiz. O ensaio foi realizado simultaneamente com duas cultivares de algodão (IMA 7501 WS e FM 975 WS).

O delineamento foi blocos casualizados com 12 tratamentos e sete repetições, e a unidade experimental foi composta de uma planta por vaso. Os resultados foram

avaliados utilizando-se software R 3.2.3. A normalidade dos dados foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk ( $P = 0,05$ ), após realização da análise de variância, as médias foram comparadas por Tukey a 5% de significância.

### **3.7 Efeito da aplicação de isolados de *Bacillus* spp. individualmente e em mistura na promoção de crescimento de plantas de algodão em rizotrons**

Os rizotrons foram construídos em tubos de PVC de 17,5 cm de diâmetro e 100 cm de comprimento, cortados longitudinalmente ao meio, com um vidro para visualização do sistema radicular e preenchidos com uma mistura de areia e solo na proporção de 1:1 (v/v).

A cultivar de algodão utilizada foi FM 975WS. As sementes foram microbiolizadas, segundo metodologia descrita no ensaio anterior, com três espécies de *Bacillus* isoladamente e em consórcio. A testemunha foi tratada apenas com água destilada e como padrão utilizou o produto biológico à base da mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Quartzo®).

No momento da semeadura foi aplicado 1 ml do caldo fermentado sobre as covas de cada tratamento, e após 15 dias da semeadura, 1 ml de cada *Bacillus* contendo células e metabólitos foi adicionado junto ao colo das plantas.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e quatro repetições. O ensaio foi conduzido até 50 dias após a semeadura, e foram realizadas três medições de comprimento de raízes (cm) antes dos 50 dias. Aos 50 dias após plantio foi determinado o diâmetro da base da haste (mm), a altura final das plantas (cm), comprimento de raízes (cm), área foliar mediante equação  $Y = 0,4322 X^{2,3002}$ , proposta por Grimes, Carter (1969) e peso fresco da parte aérea e raízes.

Os dados obtidos foram analisados por análise de variância ( $p < 0,05$ ) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando-se o software R 3.2.3.

### **3.8 Colonização de raízes de algodão por *Bacillus* spp.**

As sementes de algodão da variedade FM 975 WS foram microbiolizadas com dez isolados de *Bacillus* mediante metodologia descrita anteriormente. As sementes microbiolizadas foram colocadas em placas de Petri de 15 cm contendo o meio ágar-água no escuro para germinar. Após três dias, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio de 24 cm de comprimento por 4,5 cm de diâmetro contendo o meio Plytogel-água (1,2% v/v), previamente autoclavados. Os tubos permaneceram em BOD a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas e, após 20 dias foi avaliado a presença das bactérias ao redor do sistema radicular. Foram utilizadas quatro repetições para cada isolado e como testemunha utilizou sementes tratadas com água destilada.

### **3.9 Controle *in vivo* da murcha de *Fusarium* por *Bacillus* spp., sob cultivo protegido**

Os isolados de bactérias utilizados neste ensaio foram selecionados com base nos resultados dos testes *in vitro*, com 10 repetições e realizado simultaneamente em duas variedades de algodão (IMA 7501 WS e FM 975 WS).

Os isolados selecionados foram cultivados em meio de cultura GPL, por 48 horas em frascos, sob agitação constante a 180 rpm e a 28 °C. Após esse período, 10% de cada suspensão bacteriana foi transferida para novo Erlenmeyer contendo meio de cultura GPL, permanecendo novamente sob agitação constante a 180 rpm à 28 °C no escuro por 4 dias. A microbiolização das sementes de algodão foi realizada mediante imersão das mesmas nas culturas de bactérias (concentração de  $3 \times 10^8$  UFC/mL) por uma hora, sob agitação. As sementes foram deixadas secar a temperatura ambiente (25 °C) durante uma hora e semeadas em solo artificialmente infestado com o patógeno. Na semeadura, foi aplicado em cada cova sobre a semente 1 ml da suspensão de *Bacillus*, cultivadas em meio de cultura GPL na concentração de  $10^8$  UFC/mL. Como testemunha, foram utilizados tratamentos sem infestação com o fungo e com infestação, porém sem utilização de *Bacillus*, e também sementes tratadas com o produto biológico Serenade®, conforme recomendação do fabricante (100ml/ha). Além das aplicações de *Bacillus* sobre as sementes, foram realizadas outras duas aplicações aos 15 dias e aos 30 dias após semeadura nas mesmas quantidades descritas anteriormente.

A infestação do solo com Fov foi realizada com suspensão de esporos. O fungo obtido de uma cultura pura foi cultivado em meio BD (batata-dextrose), sob agitação constante a 180 rpm, no escuro, com temperatura de 25 °C e incubado por 10 dias. A concentração de conídios foi calibrada a  $5 \times 10^7$  conídios/mL em câmara de Neubauer, e a infestação foi realizada 15 dias antes da semeadura do algodão até atingir uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL de substrato.

A cada 15 dias foi determinada a altura das plantas, o teor de clorofila das folhas com auxílio do aparelho SPAD 502 Plus, diâmetro das hastes e a severidade da doença. Para avaliação da severidade da doença foi utilizada a escala de notas variando de 0 a 4, adaptada de Ibrahim e Nirenberg (1993) citados por Kim; Hutmacher; Davis (2005) em que 0 = ausência de sintomas; 1 = clorose e ou murcha restrita aos cotilédones ou primeira folha; 2 = clorose e ou necrose ao longo da primeira folha; 3 = sintomas severos afetando a planta inteira e 4 = planta morta. Para obter os dados em porcentagem, foi utilizado o índice de McKinney (1923), ID (%) =  $[\sum(f.v)/n.x] \times 100$ , em que: ID = índice de doença; f = número de plântulas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plântulas avaliadas; x = grau máximo da escala. Aos 50 dias, foi realizada medição da altura das plantas de algodão, índice de escurecimento vascular baseado em uma escala de notas definido por Becerra Lopez-Lavalle; Potter; Brubaker (2012) peso fresco e seco da parte área e raiz.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se software R 3.2.3. A normalidade dos dados foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk ( $P = 0,05$ ), após realização da análise de variância, as médias foram comparadas por Tukey a 5% de significância.

### **3.10 Manutenção da população de *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4**

O inóculo inicial de *M. incognita* raças 3 e 4, pertencente ao laboratório de fitonematoides da Embrapa Recursos Genéticos e Tecnologia, foram multiplicados em tomateiro (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz, cv. Santa Clara) por três meses em casa de vegetação. Após esse período, os ovos foram extraídos das plantas segundo método descrito por Hussey e Barker (1973), modificado por Boneti e Ferraz (1981). Após extração, os ovos passaram por um novo processo de limpeza para

desinfecção superficial, desenvolvido a partir do descrito por Zuckerman e Brzeski (1966). Os ovos foram ressuspensos em solução de gluconato de clorexidina (0,12%) acrescido de antibióticos (10 µg/mL eritromicina; 2,5 g/L estreptomicina) por 30 min. Em seguida foram centrifugados (3 min, 360 g). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e os ovos presentes no pellet foram ressuspensos em água destilada esterilizada. O procedimento foi repetido duas vezes. Em ambiente estéril, os ovos foram colocados em funil de Baermann modificado (FLEGG, 1967) para eclosão e obtenção dos juvenis (J2). Os J2 foram coletados a cada 2 dias, em ambiente estéril, colocados em um Becker (fechado com papel alumínio) e refrigerados ( $4 \pm 2^\circ \text{C}$ ).

### **3.11 Efeito de isolados de *Bacillus* sobre a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* raça 3 e 4 *in vitro***

Todos os 41 isolados de *Bacillus* foram pré-cultivados em meio de cultura GPL, por 48 horas em frascos, sob agitação constante a 180 rpm, a  $28^\circ \text{C}$  no escuro. Após esse período, 10% de cada suspensão bacteriana foi transferida para novo Erlenmeyer contendo meio de cultura GPL, permanecendo sob agitação constante no escuro por quatro dias, e a concentração bacteriana foi ajustada para  $10^8$  UFC/mL.

A partir dos nematoides (J2) obtidos com o funil de Baermann foi realizado o bioensaio em placas de poliestireno com 12 poços. Para a seleção de possíveis isolados antagônicos ao nematoide, foi testada inicialmente a concentração de 20% dos metabólitos de *Bacillus* spp. Em cada poço, foram adicionados 400 µl do metabólito + 1.600 µl de água esterilizada com J2, totalizando 2 ml por poço. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições. Como testemunhas, foram utilizados poços com água esterilizada + J2, e poços com água esterilizada + J2 + meio GPL. Como padrão foi utilizado o produto comercial a base de *B. subtilis* + *B. licheniformis* (Quartzo®), seguindo recomendações do fabricante. As placas foram incubadas, no escuro, em BOD com temperatura de  $25^\circ \text{C}$  por 24 horas. Após esse período, foi adicionado solução de 12 µl de NaOH a 1M (para melhor diferenciação entre móveis e imóveis), por poço, e realizado a contagem dos J2, tanto vivos quanto mortos, com auxílio da câmara de Peters e do microscópio óptico.

Os isolados cuja mortalidade superou 50% foram selecionados para um novo teste *in vitro*, porém com uma concentração de 16% dos metabólitos de *Bacillus* spp.

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita acima. No entanto, em cada poço foram adicionados 320 µl de metabólitos de *Bacillus* spp. + 1680 µl de água destilada com J2. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições. Após contagem dos nematoides foi realizado o teste de normalidade dos dados e análise de variância para mortalidade de J2. As médias foram comparadas utilizando o teste Scott-Knott com 5% de significância, com o software R 3.2.3. As bactérias, as quais apresentaram metabólitos tóxicos a J2 de *M. incognita* foram selecionadas para teste em casa de vegetação.

### **3.12 Seleção de isolados de *Bacillus* com metabólitos termoestáveis tóxicos a *M. incognita* raças 3 e 4 *in vitro***

Para este ensaio, as 41 estirpes de *Bacillus* foram pré cultivadas em meio de cultura GPL, segundo metodologia descrita no item 3.11. Em seguida, os caldos fermentados foram esterilizados em autoclave por 20 min, a 120 °C. Após esta etapa, repetiu-se metodologia descrita no item anterior para montagem do bioensaio, com concentração de 20% dos metabólitos termoestáveis de *Bacillus* spp.

### **3.13 Efeito de *Bacillus* spp. sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita* raça 3**

Para avaliação da influência de isolados de *Bacillus* sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita*, 32 isolados de *Bacillus* foram pré cultivados em meio GPL segundo metodologia descrita acima. Após o preparo, as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma concentração final de 32%.

Em cada câmara de eclosão, adaptada em placas de Petri, foram adicionadas 5 ml de cada isolado juntamente com 5 ml da suspensão de ovos de *M. incognita*, calibrada com 1000 ovos/ml. As câmaras contendo os ovos de nematoide mais as suspensões bacterianas a 16% foram mantidas em BOD a 25°C, no escuro por 28 dias. Como controles para eclosão desses nematoides foi utilizado água e o meio de cultivo GPL e, como padrão, utilizou-se *B. subtilis* + *B. licheniformis* (Quartzo®) e o nematicida químico a base de Cadusafós (Rugby®).

As avaliações foram realizadas com 7, 14, 21 e 28 dias após a montagem das câmaras de eclosão. Os percentuais de eclosão de J2 foram calculados e, para efeito

de comparação entre os tratamentos, a taxa de eclosão em água (testemunha) foi considerada 100%, comparando os demais tratamentos com a testemunha. Os dados foram transformados para raiz ( $x+0,5$ ) para atender a normalidade, e calculado a área abaixo da curva de progresso da eclosão (AACPE), mediante equação proposta por Campbell e Madden (1990):

$$\sum_{i=1}^{n-1} \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (T_{i-1} - T_i) \quad (2)$$

em que,  $Y_i$ =porcentagem de eclosão na  $i$ -ésima avaliação;  $T_i$ = tempo em dias na  $i$ -ésima avaliação;  $n$ =numero de avaliações.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 36 tratamentos, quatro repetições e quatro épocas de avaliações, submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

### **3.14 Seleção de isolados de *Bacillus* spp. antagonísticos a *M. incognita* raças 3 e 4 *in vivo***

Experimentos *in vivo* foram realizados em casa de vegetação para avaliar o controle de *M. incognita* raças 3 e 4 com isolados de *Bacillus* selecionados nos testes *in vitro* de mortalidade e eclosão de J2. Os isolados selecionados foram crescidos em meio de cultura GPL e as sementes foram microbiolizadas conforme metodologia descrita anteriormente. As sementes foram semeadas em vasos de 2,5 L, preenchidos com uma mistura de solo autoclavado e substrato (Bio Plant) na proporção de 1:1 v/v. No momento da semeadura foi aplicado 1 ml do caldo fermentado (concentração 16%) sobre as covas de cada tratamento.

Dez dias após a semeadura, foi realizada a inoculação da suspensão de ovos de *M. incognita* raças 3 e 4 (extraídos conforme descrito na atividade de manutenção de *M. incognita*). Em cada tratamento foram inoculados 6 mil ovos/vaso, distribuídos em três covas equidistantes, com aproximadamente 2 cm de profundidade. Aos 15 dias após semeadura, foi realizada uma aplicação de 1 ml do caldo fermentado de *Bacillus* spp. em cada tratamento, sendo esta operação repetida novamente aos 30

dias após semeadura, sempre com as mesmas quantidades e concentrações descritas anteriormente.

As testemunhas foram compostas por plantas tratadas com água destilada sem o tratamento de *Bacillus* spp. e com inóculo de nematoides. Além disso, o produto biológico a base de *B. licheniformis* + *B. subtilis* (Quartzo®) foi utilizado, seguindo recomendações do fabricante. O delineamento foi de oito blocos casualizados, e a unidade experimental foi composta de uma planta por vaso. Para o ensaio foram utilizadas duas variedades de algodão (IMA 7501 WS e FM 975 WS).

As plantas foram conduzidas por 100 dias. Durante o andamento do ensaio, diariamente foi realizado irrigação dos vasos e a cada 15 dias feitas aplicações do inseticida Pirate® (Clorfenapir) (1 L/ha) e do acaricida Abamectin® (Abamectina) (0,5 L/ha). Após esse período, foram avaliados os parâmetros de altura das plantas, diâmetro do colo, peso da matéria fresca das raízes, matéria fresca e seca da parte aérea, o número de ovos por planta e o fator de reprodução do nematoide (OOSTENBRINK, 1966). O fator de reprodução foi calculado com a utilização da seguinte fórmula:  $FR = (x \cdot \sigma \cdot \beta) / PI = PF / PI$ , FR – Fator de reprodução; PI – População inicial; x – Média do número de ovos encontrado por mL (contagens com a câmara de Peters);  $\sigma$  – Diluição da suspensão para contagem (30X);  $\beta$  – Volume total da suspensão (150 mL); PF – população final ou número total de ovos encontrado por vaso.

Os dados de densidade populacional de nematoides atenderam a normalidade, segundo o teste de Shapiro-Wilk ( $P = 0,05$ ). Os dados dos componentes agronômicos (altura, diâmetro do colo, peso da matéria fresca das raízes, matéria fresca e seca da parte aérea, foram submetidos a análise de variância e as comparações das médias foram realizadas pelo teste de Tukey (5% de significância), no software R 3.2.3.

### **3.15 Controle *in vivo* do complexo *Fusarium*-nematoide por *Bacillus* spp., sob cultivo protegido**

Os três isolados mais eficientes foram selecionados para avaliar seu potencial isoladamente ou em mistura, no controle do complexo *Fusarium*-Nematoide em casa de vegetação. O substrato utilizado para o experimento foi constituído por uma mistura de solo 4:1:1 (4 partes de areia, 1 parte de solo e 1 parte de esterco) obtidos na

UNESP/FCAV, previamente esterilizados em autoclave a 120°C por 40 min. O experimento foi conduzido em quatro grupos com diferentes composições de inóculo e infestação no solo. Grupo 1: solo sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoide, grupo 2: solo com inoculação apenas de nematoides, grupo 3: solo apenas com infestação de *Fusarium*, e grupo 4: solo com infestação de *Fusarium* + inoculação de nematoides.

Previamente ao enchimento dos vasos de 5 L, foi realizada a infestação do solo dos grupos 3 e 4 com Fov. Para o preparo do inóculo de Fov em talco, 500 ml da suspensão do inóculo, produzido em meio batata-dextrose, sob agitação constante a 180 rpm e a 25 °C, no escuro por sete dias foram vertidos em 1.000 g de talco neutro, incubados por 10 dias à 25 °C e seco durante 30 dias à temperatura ambiente (DE CAL et al., 1995). Após a secagem foram determinadas as unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo, por meio do método de diluição em série e plaqueamento das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em meio de cultura semi seletivo para *Fusarium* spp. (NASH; SNYDER, 1962). Após esse processo, foi adicionado 50 g de talco por vaso (1% de talco/vaso) e homogeneizado com o solo. A concentração final de Fov no solo foi de  $10^4$  clamidósporos por grama de solo. Para cada grupo foram utilizados como tratamentos os três isolados de *Bacillus*, a mistura entre eles, *B. subtilis* + *B. licheniformis* (Quartzo<sup>®</sup>), nematicida químico a base de Cadusafós (Rugby<sup>®</sup>) (8 L/50 L de calda) e uma testemunha tratada apenas com água destilada.

Os isolados foram crescidos em meio de cultura GPL conforme descrito anteriormente. Nos tratamentos de consórcio de *Bacillus*, a concentração de cada isolado permaneceu  $1 \times 10^8$  UFC/ml. As sementes foram microbiolizadas conforme metodologia descrita anteriormente. Antes da semeadura, com exceção dos tratamentos com nematicida biológico e químico, foi adicionado 1 ml dos tratamentos na cova de plantio. Na testemunha a cova foi tratada com água destilada. Em cada vaso foram semeadas três sementes, deixando apenas uma planta por vaso após o sexto dia.

Dez dias após a semeadura, nos grupos 2 e 4 foram inoculados ovos de *M. incognita* raça 3. Os ovos de nematoides foram extraídos conforme descrito anteriormente, e inoculados 6 mil ovos/vaso em duas covas equidistantes do caule da planta, com, aproximadamente, 2 cm de profundidade.

Aos 17 dias após inoculação dos ovos de nematoide, foi realizada uma inoculação de *Fusarium* nos grupos 3 e 4. Para a produção desse inóculo, discos de

micélio de 5 mm de Fov foram adicionados em Erlenmeyers com meio batata-dextrose, sob agitação constante a 180 rpm e a 25 °C, no escuro por sete dias. Desse modo, a concentração final foi de  $5,0 \times 10^6$  conídios/ml. Em cada vaso desses grupos foram adicionados 25 ml dessa suspensão de *Fusarium* + 75 ml de H<sub>2</sub>O.

Aos 30 dias após semeadura, em todos vasos de todos os grupos foi realizada uma segunda aplicação de *Bacillus* contendo células e metabólitos. Para a multiplicação das espécies de *Bacillus* foi utilizada metodologia descrita anteriormente. Em cada vaso foi adicionado 10 ml da suspensão de *Bacillus* + 90 ml de H<sub>2</sub>O, com concentração final ajustada para  $10^7$  UFC/ml.

O delineamento utilizado foi de blocos casualizados com nove tratamentos, 10 repetições, quatro grupos de solos, duas épocas de avaliação. A unidade amostral foi composta de uma planta por vaso. A cultivar de algodão utilizada foi FM 975 WS. As plantas foram conduzidas até 60 e 120 dias após semeadura em vasos de 5 litros. Durante a condução do ensaio, duas vezes por dia a irrigação da casa de vegetação era ligada, a cada 7 dias foi aplicado os inseticidas Pirate® (1 L/ha) e Privilege® (0,25 L/ha) para controle de tripes e mosca branca, foi realizada duas adubações de 80 kg/ha de uréia aos 40 e 92 dias após semeadura e aos 35 dias após semeadura foi adicionado palha nos vasos para manter a umidade e diminuir a temperatura do solo.

Altura das plantas, teor de clorofila das folhas com auxílio do aparelho SPAD 502 Plus, porcentagem de escurecimento vascular (caminhamento interno de Fov), pesos da matéria fresca da parte aérea e das raízes, contagem do número de ovos de nematoides nas raízes e o fator de reprodução do nematoide (FR), calculado com base na descrição do item anterior, foram avaliados nas duas datas.

Para análise estatística foi verificada a normalidade dos dados usando o teste de Shapiro-Wilk ( $P = 0,05$ ). Foi calculado a densidade populacional de nematoides e o fator de reprodução e, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância) utilizando-se o software R 3.2.3.

### **3.16 Identificação das espécies de *Bacillus* por sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA**

Os isolados foram cultivados em meio de cultura GPL, por 48 horas em frascos, sob agitação constante a 180 rpm a 28 °C no escuro. A extração de DNA total foi

obtida utilizando o kit MO BIO *UltraClean* Microbial DNA Isolation (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O DNA genômico foi isolado e purificado pelo kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen – Carlsbad, CA, Estados Unidos). A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi modulada pelo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), (LANE, 1991) em equipamento Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, Foster CA, USA), a partir da reação: 1 µL de DNA [10 nanogramas (ng)], 2,5 µL de 10x PCR buffer [Tris-HCl 200 milimolar (pH 8,4), KCl 500 mM], 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 de µL dNTP mix (10 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 µL dos oligonucleotídeos (10 µM), 0,3 µL de Taq DNA polymerase e 18,45 µL de água ultrapura esterilizada. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: (1) 94 °C por 2 minutos (min), (2) 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, (3) 72 °C por 10 min, conforme White et al. (1990).

Os produtos de PCR foram purificados e quantificados usando os kits Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectivamente. Em seguida, os fragmentos gênicos foram amplificados utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Foster, CA, USA), conforme: 1 µL PCRp (35 ng), 2 µL 5x BigDye Terminator Sequencing Buffer, 1,6 µL oligonucleotídeos iniciadores (5 pmol), 1 µL Ready Reaction PreMix BigDye e 4,4 µL água ultrapura esterilizada. Os parâmetros de ciclagem aplicados foram: (1) 96 °C por 1 min, (2) 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos (seg), 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min, em equipamento Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, Foster CA, USA). O conjunto de iniciadores utilizados na reação foram 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 704R (5'-TCTACGSATTTACCCTAC-3') (LANE, 1991). O sequenciamento foi realizado no analisador genético Applied Biosystems 3500 (Life Technologies, Foster CA, USA).

As assinaturas taxonômicas dos isolados selecionados foram determinadas pelo sequenciamento do gene que codifica para o rRNA 16S. Os produtos de PCR previamente purificados foram amplificados usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing e os oligonucleotídeos iniciadores: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 357F (5'- CCTACGGGAG-3'), 357R (5'-CTGCGCCTCCCGTAGG-3'), 704F (5'- GTAGSGGTGAATSCCTAGA-3'), 704R (5'-

TCTACGSATTTACCCCTAC-3'), 1114R (5'-GGGTYKCGCTCGTTGC-3'), 1114F (5'-CGGCAACGAGCGCAACCC3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). O sequenciamento foi realizado no analisador genético Applied Biosystems 3500. As condições para amplificação e os parâmetros de ciclagem seguiram conforme apresentado acima.

A avaliação de qualidade e a montagem dos contigs consenso foram realizadas no programa PhredPhrap/Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O índice de similaridade entre as sequências obtidas, com as sequências 16S rRNA disponíveis no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), foram determinadas a partir da plataforma EzBioCloud (YOON et al., 2017).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção de ácido indolacético, ácido cianídrico, sideróforos e catalase; solubilização de fosfatos e assimilação de nitrogênio por isolados de *Bacillus* spp.

A relação de resultados dos testes bioquímicos está apresentada na Tabela 1. Os isolados foram considerados positivos (+) e negativos (-) para os testes. Nenhum isolado produziu ácido cianídrico (HCN). Vinte isolados apresentaram resultados positivos para a produção de ácido indolacético (AIA), quatro para a solubilização de fosfato (SP), 25 para assimilação de nitrogênio (AN), 23 para a produção de sideróforos (SID) e 21 para catalase (CAT) (Tabela 1). Dessa maneira, os isolados S2531, S2535, S2545, S2548, S2552, S2554, S2555 e S2557 foram selecionados por apresentarem quatro resultados positivos ou mais.

**Tabela 1 - Produção de ácido indolacético – AIA; ácido cianídrico – HCN; assimilação de nitrogênio – AN; catalase – CAT; sideróforos SID e solubilização de fosfato - SP por isolados de *Bacillus* spp**

(continua)

Isolados	AIA	HCN	AN	CAT	SID	SP
AP 03	-	-	+	+	+	-
AP 61	-	-	-	+	-	-
AP 115	-	-	+	-	-	-
AP 117	-	-	+	+	+	-
AP 210	-	-	+	+	+	-
S2527	+	-	-	-	-	-
S2528	+	-	-	-	+	-
S2529	+	-	+	-	+	-
S2530	+	-	+	-	+	-
S2531	+	-	+	-	+	+
S2532	+	-	+	-	+	-
S2533	+	-	+	-	+	-
S2535	+	-	+	+	+	-
S2536	+	-	+	-	+	-
S2538	-	-	-	+	+	+
S2540	+	-	+	-	+	-
S2543	-	-	-	-	-	-

						(conclusão)
S2545	+	-	+	+	+	-
S2547	-	-	+	+	-	-
S2548	+	-	+	+	+	-
S2549	-	-	-	+	-	-
S2550	-	-	+	+	-	-
S2551	+	-	-	-	-	-
S2552	+	-	+	+	+	+
S2553	+	-	+	-	+	-
S2554	+	-	+	-	+	+
S2555	+	-	+	+	+	-
S2556	-	-	-	-	-	-
S2557	+	-	+	+	+	-
S2558	-	-	-	-	+	-
S2559	-	-	-	-	-	-
S2560	-	-	-	-	-	-
S2561	-	-	-	+	-	-
S2562	+	-	+	+	-	-
S2563	-	-	-	+	-	-
S2564	-	-	+	+	-	-
S2568	-	-	+	+	+	-
S2569	+	-	-	-	+	-
S2571	-	-	-	-	-	-
S2573	-	-	-	+	-	-
QST 713	-	-	+	+	-	-

---

Positivo (+); negativo (-)

#### 4.2 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por isolados de *Bacillus*

No teste de inibição, dentre os 41 isolados testados de *Bacillus*, onze (S2535, S2543, S2545, S2557, S2560, S2564, AP 03, AP 210, AP115, AP 117 e QST 713) exibiram halos de inibição (Tabela 2, Figura 1) quando confrontado com *Fov*. Entretanto, 30 isolados de *Bacillus* não apresentaram atividade antagônica contra *Fov* (Figura 2). Os isolados S2543, S2545, QST713, AP03 e S2557 não diferiram entre si, contudo o isolado S2543 foi o que apresentou o maior halo de inibição (11,24 mm) inibindo em 25,9%.

**Tabela 2 - Formação de halos de inibição por isolados de *Bacillus* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro**

Isolados de <i>Bacillus</i>	Halos de inibição (mm)
S2543	11,2 a
S2545	10,9 a
QST 713	10,1 a
AP 03	8,9 a
S2557	8,2 a
S2560	6,7 b
AP 210	6,2 b
S2564	6,0 b
S2535	5,0 b
AP 115	2,1 c
AP 117	1,8 c
CV (%)	27,3

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

**Figura 1 - Isolados de *Bacillus* que apresentaram halos de inibição contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro**

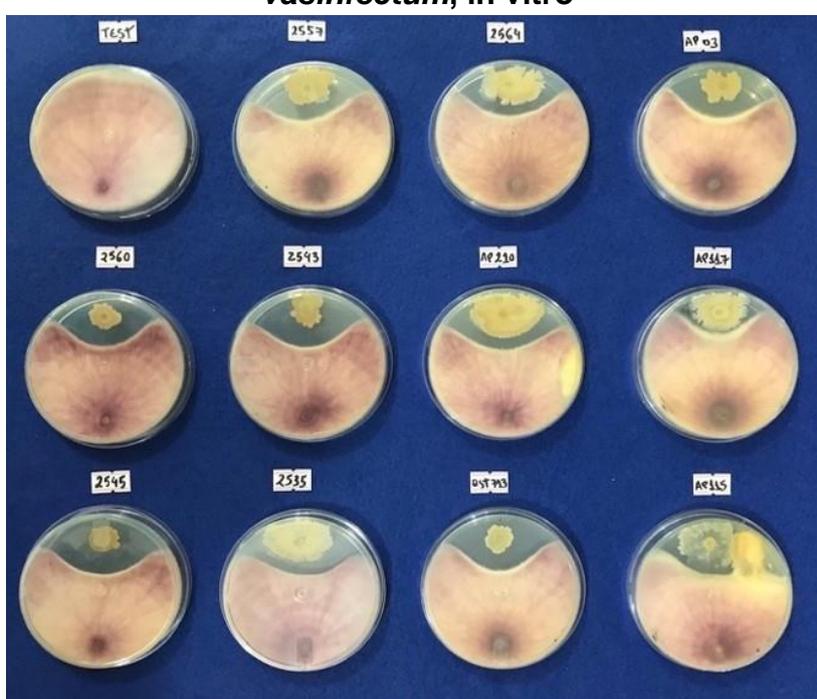


Figura 2 - Isolados de *Bacillus* que não exibiram atividade antagônica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *in vitro*



#### 4.3 Estudo da inibição da germinação de esporos de *Fusarium*

Quinze isolados de *Bacillus* reduziram significativamente a germinação dos esporos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Tabela 3). Os isolados que apresentaram as maiores inibições da germinação de esporos foram S2545 (80,9%), S2548 (80,6%), AP 115 (71,0%), AP 03 (69,2%) e S2543 (68,7%), não apresentando diferença estatística entre si.

**Tabela 3 - Inibição da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por *Bacillus* spp**

<b>Isolados</b>	<b>% Inibição da germinação de conídios</b>
S2545	80,9 a
S2548	80,6 a
AP 115	71,0 a
AP 03	69,2 a
S2543	68,7 a
AP 210	54,9 b
S2555	52,2 b
QST 713	48,5 b
AP 117	41,1 b
S2538	41,1 b
S2535	35,8 c
S2552	33,4 c
S2569	23,8 d
S2564	18,5 d
S2560	18,3 d
S2531	6,3 e
S2557	2,1 e
S2573	0,5 e
S2527	0,3 e
CV (%)	24,5

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

#### **4.4 Termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. *in vitro***

Os isolados de *Bacillus* que produziram metabólitos termoestáveis mais eficientes na inibição de Fov foram os isolados S2545 e S2548, nas concentrações de 5 e 10 % (Tabela 4 e Figuras 3 e 4). Estes isolados exibiram valores significativos de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) ( $P \leq 0,05$ ), durante os cinco dias de produção dos metabólitos. O isolado AP 210 na concentração de 10% no quarto dia de multiplicação (Figura 5), proporcionou o menor IVCM (15,99) e a maior

porcentagem (54%) de inibição do crescimento micelial, enquanto que os isolados S2548 e S2545 exibiram um IVCM de 17,65 e 50,05% de inibição do crescimento micelial (Figura 6). Esses resultados indicam que os metabólitos com atividade antimicrobiana presentes no caldo agarizado autoclavado são termoestáveis resistindo às altas temperaturas sem perder as características antifúngicas e seu modo de antagonismo a Fov.

**Tabela 4 - Efeito da concentração e dos dias de multiplicação dos metabólitos de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

(continua)

Isolados	Tempo de multiplicação (dias)	Concentração do meio (%)	IVCM
AP 210	4	10	15,99 a
S2548	3	10	17,65 a
S2545	3	10	17,65 a
S2548	5	10	17,79 a
S2548	4	10	18,96 b
S2545	2	10	19,06 b
S2545	4	10	19,12 b
S2545	5	10	19,17 b
S2548	2	10	19,30 b
S2545	2	5	20,93 c
S2548	3	5	21,27 c
S2548	4	5	21,74 c
S2548	1	10	22,21 c
S2548	5	5	23,39 d
S2548	3	5	23,80 d
S2545	1	5	23,90 d
S2548	2	5	24,49 d
S2557	4	5	24,49 d
S2545	4	5	24,55 d
S2545	5	5	24,73 d
QST 713	1	10	24,92 d
AP 03	3	10	24,98 d
S2557	2	5	25,08 d
AP 03	5	10	25,44 e
AP 03	2	10	25,72 e
S2557	5	10	25,73 e

				(continuação)
QST 713	2	10	25,84 e	
AP 03	3	5	26,19 e	
S2557	3	5	26,21 e	
S2557	1	5	26,30 e	
S2545	1	10	26,34 e	
AP 210	2	10	26,46 e	
AP 03	1	10	26,53 e	
AP 03	4	5	26,67 e	
S2557	3	10	26,89 e	
AP 03	2	5	27,01 f	
QST 713	2	5	27,34 f	
AP 210	1	10	27,39 f	
AP 03	4	10	27,54 f	
S2557	2	10	27,76 f	
AP 210	2	5	27,84 f	
QST 713	3	10	27,89 f	
AP 210	3	10	28,03 f	
S2557	1	10	28,13 f	
AP 03	5	5	28,23 f	
QST 713	4	10	28,45 f	
AP 210	5	5	28,57 f	
AP 03	1	5	28,72 f	
QST 713	5	5	29,02 f	
AP 210	5	10	29,03 f	
S2557	5	5	29,40 f	
QST 713	1	5	29,41 f	
AP 210	1	5	29,56 f	
QST 713	3	5	29,76 g	
AP 210	4	5	29,77 g	
QST 713	4	5	30,18 g	
QST 713	5	10	30,23 g	
AP 210	3	5	30,24 g	
S2573	5	10	30,24 g	
S2548	1	5	30,43 g	
S2552	2	10	30,59 g	
S2552	5	10	30,92 g	
S2552	3	10	31,62 g	
S2552	3	5	33,30 h	
S2552	4	10	33,68 h	
S2573	1	10	33,84 h	
S2552	1	10	34,70 h	
S2543	2	5	34,72h	

			(conclusão)
S2543	3	10	34,72 h
S2573	3	10	34,72 h
S2573	2	5	34,93 h
S2543	5	5	34,95 h
S2573	5	5	35,20 h
S2573	4	5	35,22 h
Testemunha			35,32 h
S2573	1	5	35,45 h
S2573	3	5	35,46 h
S2573	4	10	35,53 h
S2543	4	5	35,75 i
S2543	4	10	35,88 i
S2552	4	5	36,12 i
S2552	2	5	36,36 i
S2543	3	5	36,43 i
S2543	2	10	36,46 i
S2573	2	10	36,59 i
S2543	1	5	36,72 i
S2543	5	10	36,76 i
S2552	1	5	36,94 i
S2543	1	10	37,62 i
S2552	5	5	38,80 i
CV(%)			4,42

\*\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

Figura 3 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelo isolado de *Bacillus* S2545 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro, nas concentrações 5% (A) e 10% (B). Test - Testemunha (100% BDA). 1,2,3,4,5 - Dia da multiplicação do metabólito.

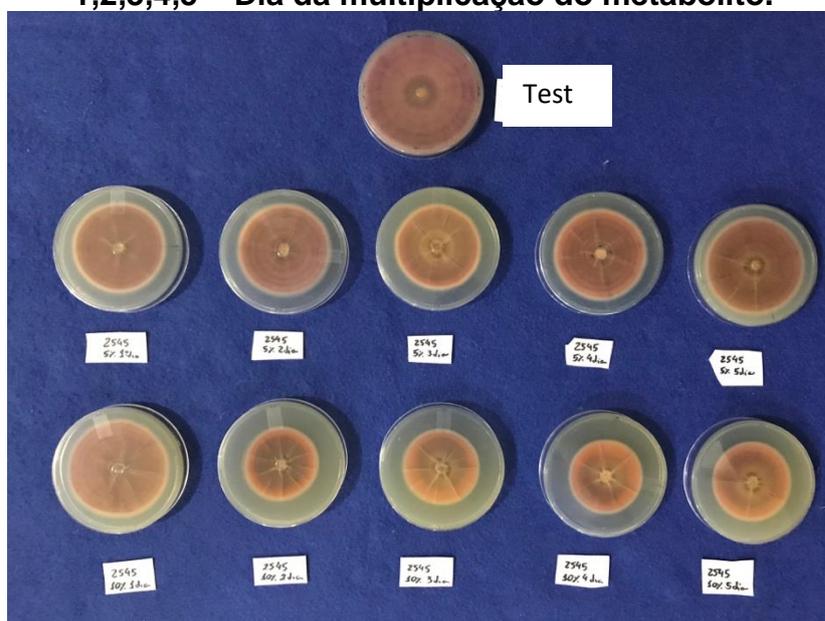
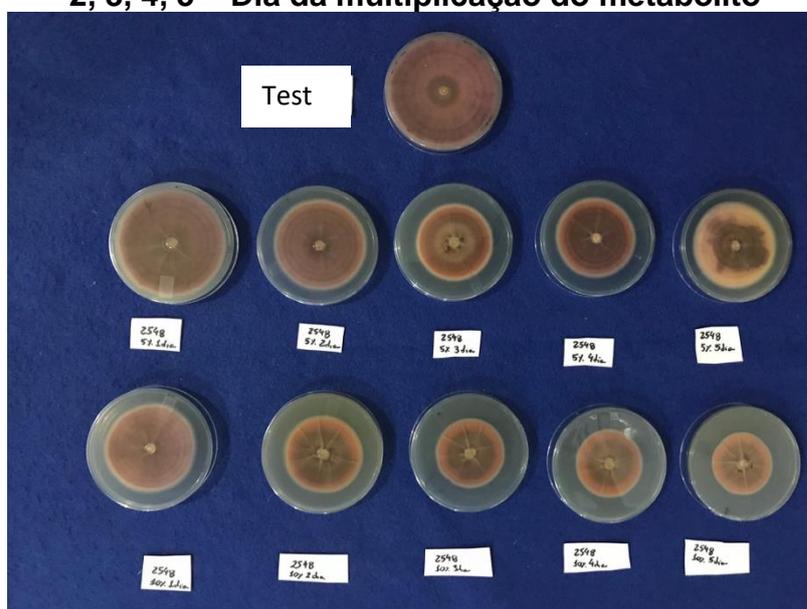
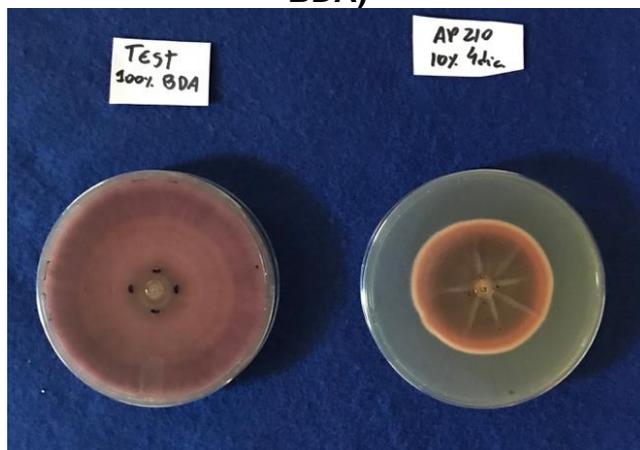


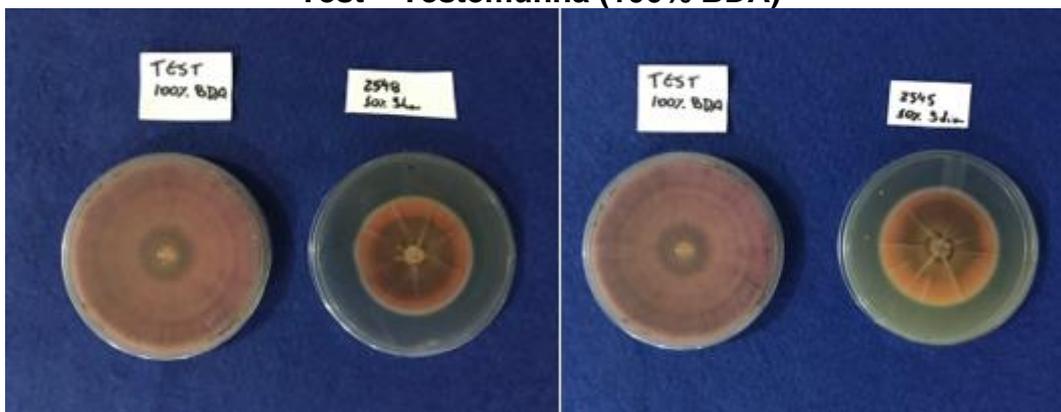
Figura 4 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos pelo isolado de *Bacillus* S2548 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro, nas concentrações 5% (A) e 10% (B). Test - Testemunha (100% BDA). 1, 2, 3, 4, 5 - Dia da multiplicação do metabólito



**Figura 5 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzido pelo isolado de *Bacillus* AP 210 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro, na concentração de 10% ao quarto dia da multiplicação. Test – Testemunha (100% BDA)**



**Figura 6 - Produção e termoestabilidade de metabólitos produzido pelos isolados de *Bacillus* S2548 (A) e S2545 (B) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, in vitro, na concentração de 10% ao terceiro dia da multiplicação. Test – Testemunha (100% BDA)**



#### 4.5 Promoção de crescimento de algodoeiro por *Bacillus* spp.

##### 4.5.1 Avaliação da promoção de crescimento após 15 dias da semeadura

Aos 15 dias após semeadura não foram observados efeitos significativos ( $P \leq 0,05$ ) dos isolados de *Bacillus* em nenhum dos parâmetros avaliados (altura das plantas, comprimento de raiz, peso fresco e seco de parte aérea e de raízes) nas cultivares IMA 6501B2FR (Tabela 5), IMA 7201B2FR (Tabela 6) e IMA 7501WS (Tabela 7).

**Tabela 5 - Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 6501B2FR, aos 15 dias**

	Altura (cm)	Comprimento de raiz (cm)	PFFA (g)	PFR (g)	PSPA (g)	PSR (g)
Test	12,35	18,09	1,23	0,73	0,09	0,03
2527	11,79	16,53	1,20	0,54	0,13	0,04
2528	10,97	16,93	1,09	0,57	0,11	0,04
2529	12,92	18,13	1,46	0,86	0,18	0,05
2531	11,58	17,06	1,20	0,55	0,14	0,03
2532	12,62	16,70	1,28	0,57	0,15	0,04
2533	12,48	16,80	1,34	0,57	0,13	0,04
2535	13,47	16,39	1,20	0,51	0,12	0,03
2569	10,69	16,46	1,20	0,51	0,13	0,03
2530	15,03	14,89	1,19	0,50	0,14	0,03
2540	13,30	16,02	1,05	0,45	0,11	0,03
2543	12,12	16,58	1,30	0,58	0,14	0,04
2545	11,92	15,93	0,81	0,38	0,12	0,03
2548	11,92	16,83	1,17	0,52	0,12	0,03
2549	12,96	17,56	1,22	0,55	0,11	0,03
2550	13,92	17,23	1,53	0,65	0,18	0,04
2551	12,11	15,76	1,14	0,54	0,12	0,03
2552	10,85	15,22	1,11	0,44	0,13	0,02
2553	11,88	15,69	0,83	0,53	0,09	0,03
2554	13,21	15,93	0,70	0,41	0,11	0,03
2555	13,45	15,71	1,17	0,45	0,13	0,03
2556	14,17	16,97	1,35	0,53	0,14	0,03
2557	12,18	16,28	1,13	0,56	0,14	0,03
2558	14,49	17,13	1,44	0,58	0,14	0,13
2559	12,46	15,53	1,28	0,45	0,14	0,02
2562	12,56	16,17	1,46	0,41	0,14	0,03
2536	12,90	16,39	1,13	0,50	0,11	0,03
2560	12,58	16,59	1,19	0,48	0,13	0,03
2564	12,60	16,71	1,19	0,57	0,14	0,04
2561	12,54	18,81	1,30	0,64	0,15	0,04
2571	13,09	16,74	1,49	0,59	0,15	0,04
2563	14,39	16,00	1,10	0,53	0,12	0,03
2538	12,78	16,04	1,30	0,63	0,13	0,04
2568	14,24	15,61	1,13	0,47	0,13	0,03
2573	13,56	16,19	1,41	0,79	0,12	0,04
AP 03	13,36	16,06	1,31	0,66	0,15	0,04
AP 61	12,67	15,04	1,19	0,48	0,13	0,03
AP 115	12,88	13,17	1,47	0,59	0,13	0,03
AP 117	12,83	16,11	1,39	0,44	0,14	0,02
AP 210	12,64	16,72	1,17	0,56	0,11	0,04
QST 713	15,58	16,25	1,12	0,50	0,14	0,04
CV (%)	14,16	14,02	18,70	25,14	23,04	31,02

\*De acordo com o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), não houve diferença significativa entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados.

**Tabela 6 - Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7201B2FR, aos 15 dias**

	<b>Altura (cm)</b>	<b>Comprimento de raiz (cm)</b>	<b>PFFA (g)</b>	<b>PFR (g)</b>	<b>PSPA (g)</b>	<b>PSR (g)</b>
Test	13,19	18,19	1,49	0,66	0,17	0,07
2527	13,94	17,17	1,43	0,61	0,16	0,03
2528	13,58	16,28	1,59	0,66	0,12	0,04
2529	14,64	18,31	1,55	0,61	0,18	0,03
2531	14,50	17,73	1,55	0,63	0,18	0,03
2532	14,04	17,32	1,58	0,70	0,18	0,03
2533	11,93	16,00	1,37	0,66	0,15	0,06
2535	12,83	16,72	1,56	0,58	0,17	0,04
2569	14,60	17,33	1,52	0,58	0,19	0,03
2530	14,68	18,32	1,56	0,83	0,17	0,04
2540	13,61	15,92	1,51	0,62	0,16	0,03
2543	13,34	16,33	1,57	0,62	0,17	0,03
2545	13,85	16,58	1,58	0,69	0,14	0,15
2548	15,12	17,73	1,54	0,65	0,18	0,03
2549	13,73	17,00	1,47	0,57	0,15	0,03
2550	12,29	17,75	1,26	0,51	0,16	0,03
2551	15,02	18,46	1,63	0,66	0,17	0,04
2552	13,51	17,84	1,29	0,56	0,14	0,03
2553	14,22	17,02	1,49	0,61	0,18	0,03
2554	14,58	17,27	1,46	0,61	0,14	0,03
2555	13,94	15,68	1,60	0,51	0,19	0,03
2556	15,14	16,44	1,56	0,85	0,17	0,04
2557	13,45	18,58	1,62	0,63	0,18	0,03
2558	13,06	17,61	1,66	0,66	0,21	0,03
2559	14,67	17,27	1,53	0,62	0,17	0,04
2562	12,75	16,77	1,53	0,58	0,16	0,03
2536	14,34	18,47	1,55	0,67	0,17	0,04
2560	13,86	17,73	1,36	0,61	0,20	0,03
2564	14,01	16,96	1,55	0,72	0,18	0,04
2561	13,29	16,44	1,42	0,55	0,17	0,03
2571	13,59	18,16	1,52	0,62	0,19	0,04
2563	14,02	17,19	1,65	0,59	0,21	0,03
2538	16,15	15,97	1,59	0,54	0,19	0,04
2568	13,75	15,86	1,53	0,64	0,18	0,03
2573	14,15	18,09	1,71	0,67	0,21	0,04
AP 03	14,34	18,55	1,53	0,74	0,17	0,04
AP 61	13,73	17,15	1,35	0,63	0,14	0,04
AP 115	15,58	18,28	1,77	0,53	0,18	0,04
AP 117	12,48	14,96	1,43	0,65	0,16	0,03
AP 210	14,16	17,40	1,54	0,70	0,19	0,03
QST 713	12,75	16,64	1,44	0,79	0,20	0,04
CV (%)	14,16	14,02	18,7	25,14	23,04	31,02

\*De acordo com o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), não houve diferença significativa entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados.

**Tabela 7 - Efeito de isolados de *Bacillus* spp. na altura, comprimento de raízes e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7501 WS, aos 15 dias**

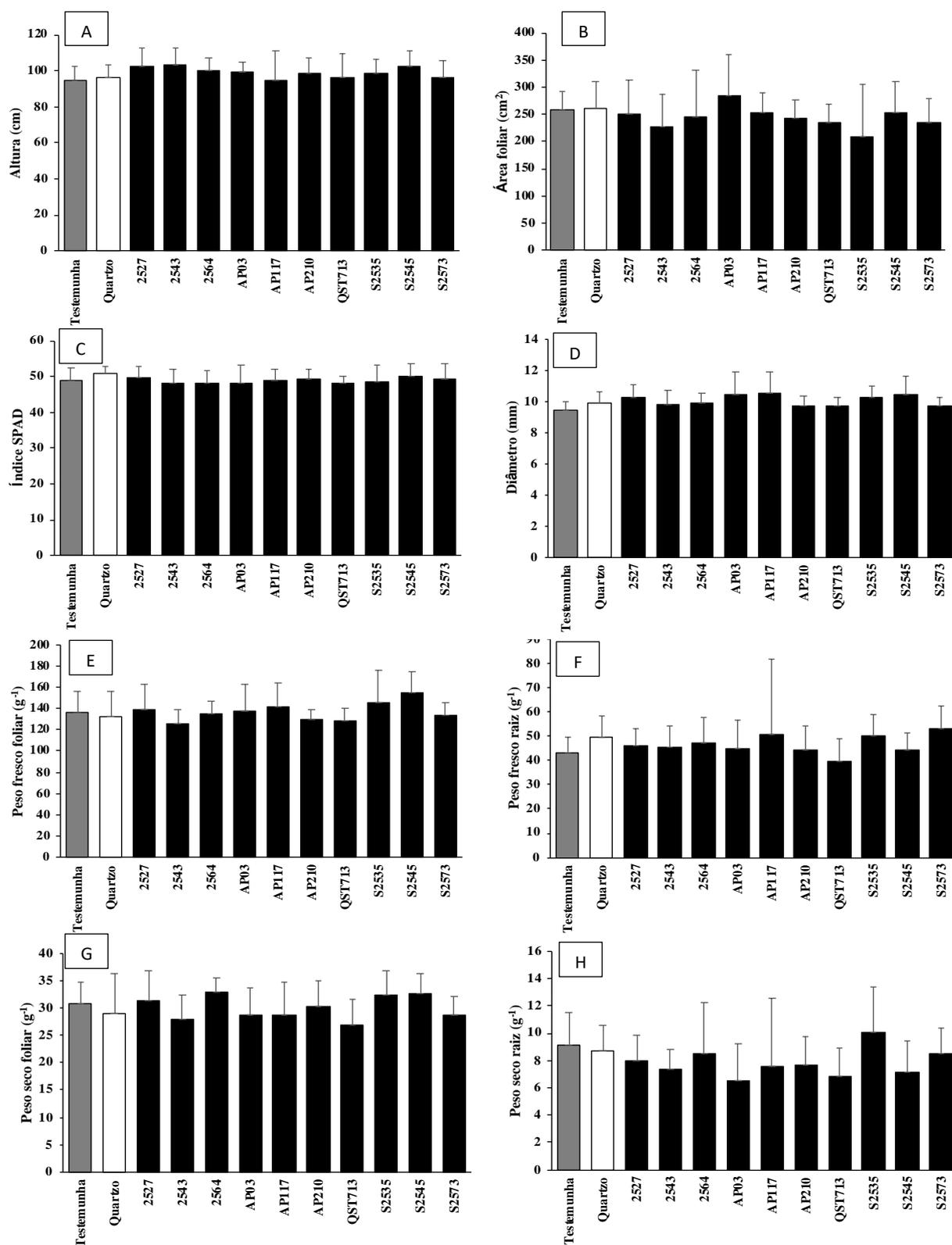
	<b>Altura (cm)</b>	<b>Comprimento de raiz (cm)</b>	<b>PFPA (g)</b>	<b>PFR (g)</b>	<b>PSPA (g)</b>	<b>PSR (g)</b>
Test	15,41	18,36	1,91	0,70	0,18	0,03
2527	14,50	17,52	1,86	0,75	0,19	0,03
2528	13,00	17,52	1,68	0,50	0,19	0,04
2529	14,92	18,94	1,75	0,60	0,18	0,04
2531	15,41	18,32	1,90	0,50	0,20	0,03
2532	14,56	18,12	1,45	0,54	0,16	0,04
2533	16,77	18,87	1,58	0,65	0,19	0,04
2535	16,38	18,85	1,55	0,60	0,17	0,04
2569	13,69	18,70	1,48	0,55	0,17	0,04
2530	15,04	16,33	1,46	0,42	0,16	0,03
2540	14,94	17,53	1,60	0,57	0,20	0,04
2543	13,90	18,59	1,50	0,60	0,15	0,04
2545	13,68	18,26	1,57	0,49	0,20	0,03
2548	15,45	16,53	1,79	0,69	0,21	0,05
2549	14,07	16,56	1,86	0,60	0,17	0,04
2550	13,73	17,61	1,43	0,48	0,18	0,03
2551	14,55	17,44	1,75	0,54	0,18	0,03
2552	14,37	18,79	1,71	0,60	0,19	0,04
2553	13,70	18,10	1,55	0,78	0,19	0,05
2554	14,15	17,50	1,39	0,46	0,14	0,03
2555	15,11	15,88	1,52	0,46	0,18	0,03
2556	13,54	17,28	1,40	0,57	0,17	0,03
2557	16,40	17,60	1,60	0,55	0,17	0,03
2558	16,86	19,20	1,75	0,63	0,18	0,04
2559	14,84	19,25	1,73	0,65	0,22	0,04
2562	14,25	16,63	1,52	0,53	0,19	0,03
2536	15,31	17,60	1,79	0,54	0,20	0,04
2560	14,33	17,22	1,86	0,59	0,17	0,03
2564	14,89	16,93	1,69	0,58	0,18	0,04
2561	13,86	18,05	1,54	0,64	0,19	0,04
2571	14,24	17,24	1,68	0,61	0,17	0,04
2563	14,80	16,05	1,60	0,54	0,18	0,03
2538	12,70	17,71	1,33	0,50	0,15	0,03
2568	15,23	16,67	1,70	0,66	0,18	0,04
2573	12,81	18,42	1,47	0,65	0,17	0,05
AP 03	16,40	17,33	1,91	0,74	0,18	0,04
AP 61	16,44	18,04	1,83	0,64	0,27	0,03
AP 115	15,07	17,76	1,58	0,56	0,17	0,03
AP 117	15,82	17,95	1,48	0,58	0,14	0,03
AP 210	14,28	18,11	1,70	0,57	0,19	0,04
QST 713	14,99	17,93	1,67	0,57	0,17	0,03
CV (%)	14,16	14,02	18,7	25,14	23,04	31,02

\*De acordo com o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), não houve diferença significativa entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados.

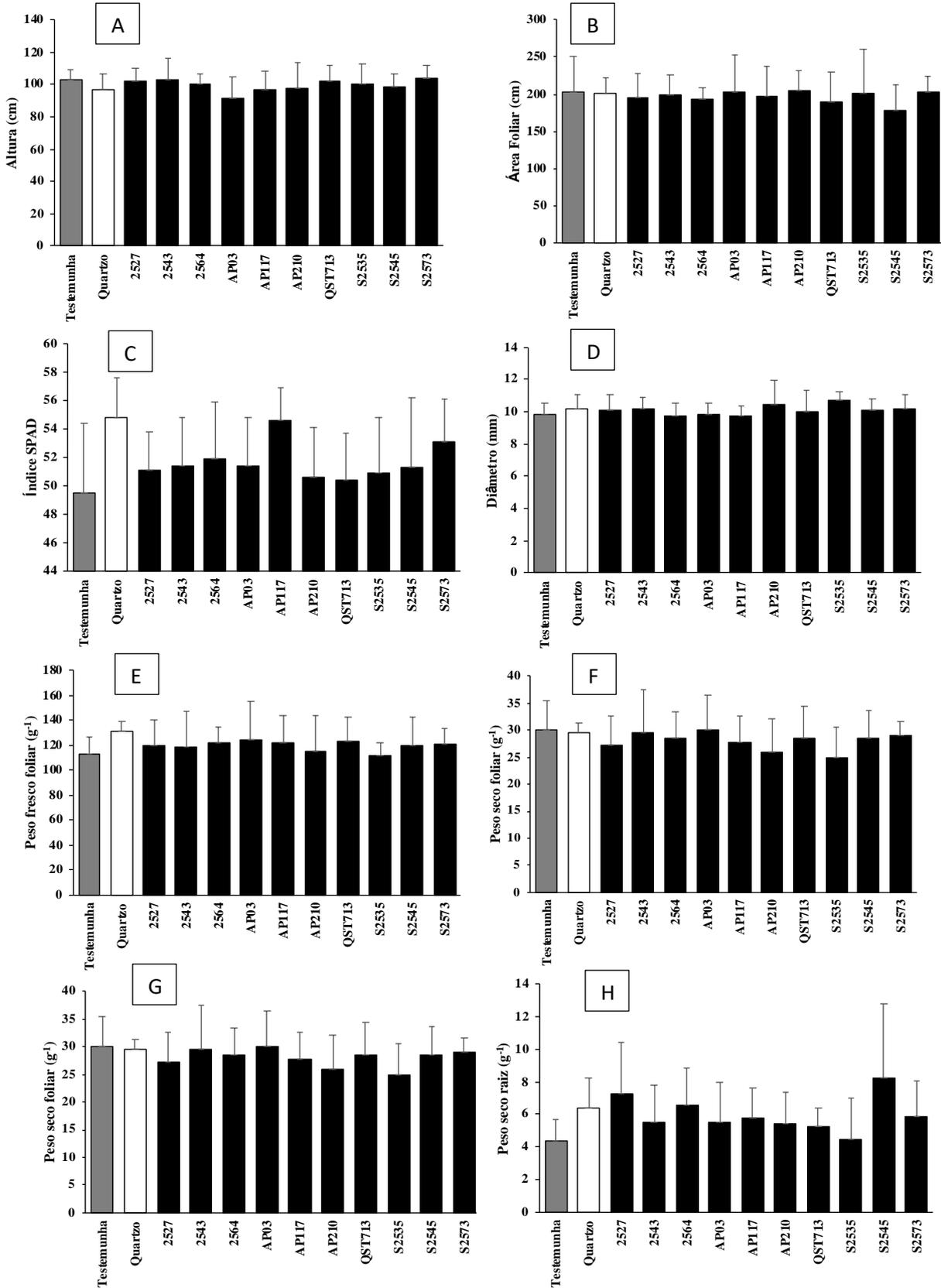
#### **4.5.2 Avaliação da promoção de crescimento aos 80 dias**

Na avaliação de promoção de crescimento decorridos 80 dias também não foram verificadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para os parâmetros de altura, índice SPAD, diâmetro do caule, área foliar e peso fresco e seco da parte aérea e raízes nas variedades IMA 7501WS (Figura 7) e FM 975 WS (Figura 8).

**Figura 7 - Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, área foliar, índice SPAD, diâmetro e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar IMA 7501 WS, aos 80 dias. Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)**



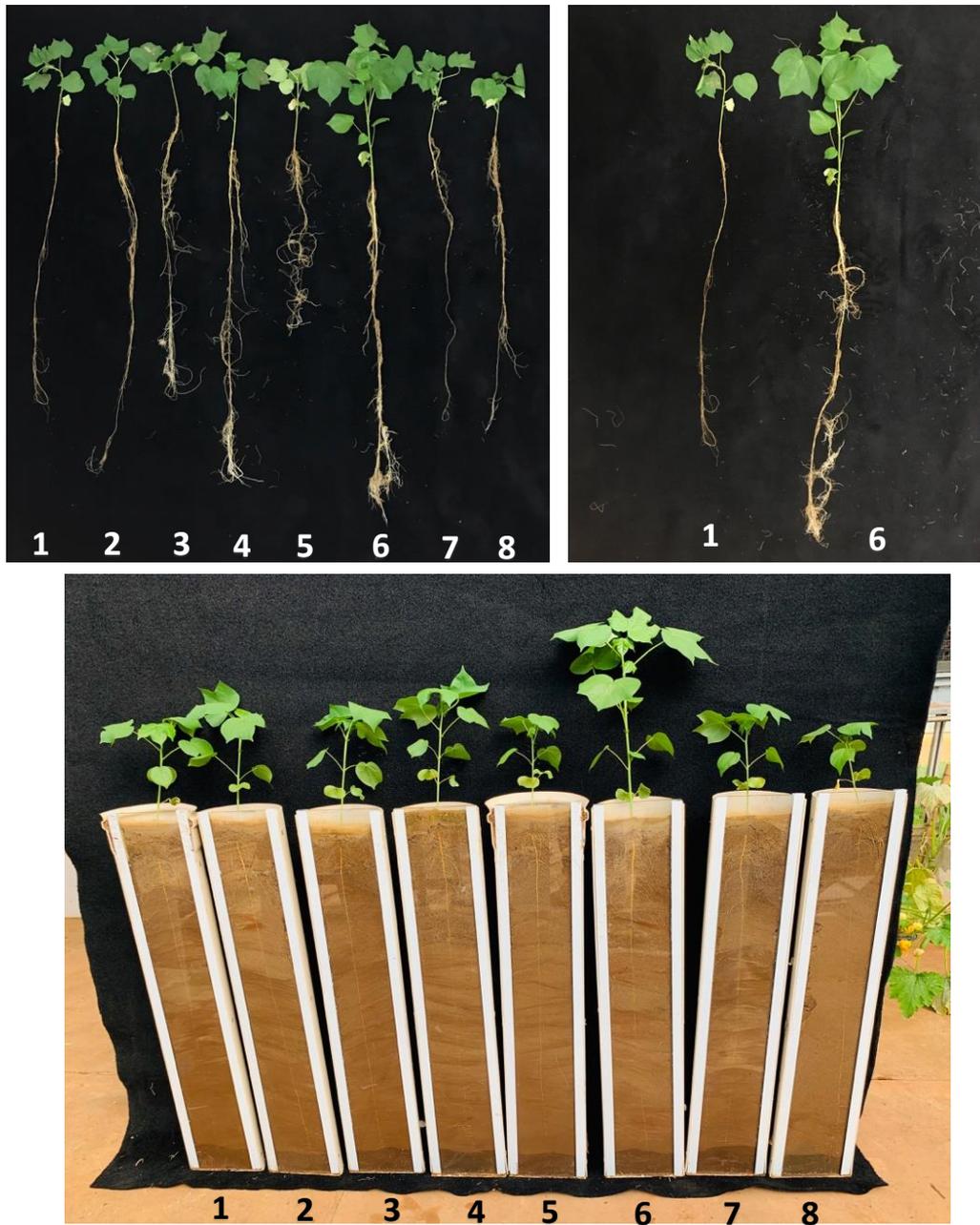
**Figura 8 - Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, área foliar, índice SPAD, diâmetro e pesos frescos e secos de parte aérea e raiz na cultivar FM 975 WS, aos 80 dias. Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)**



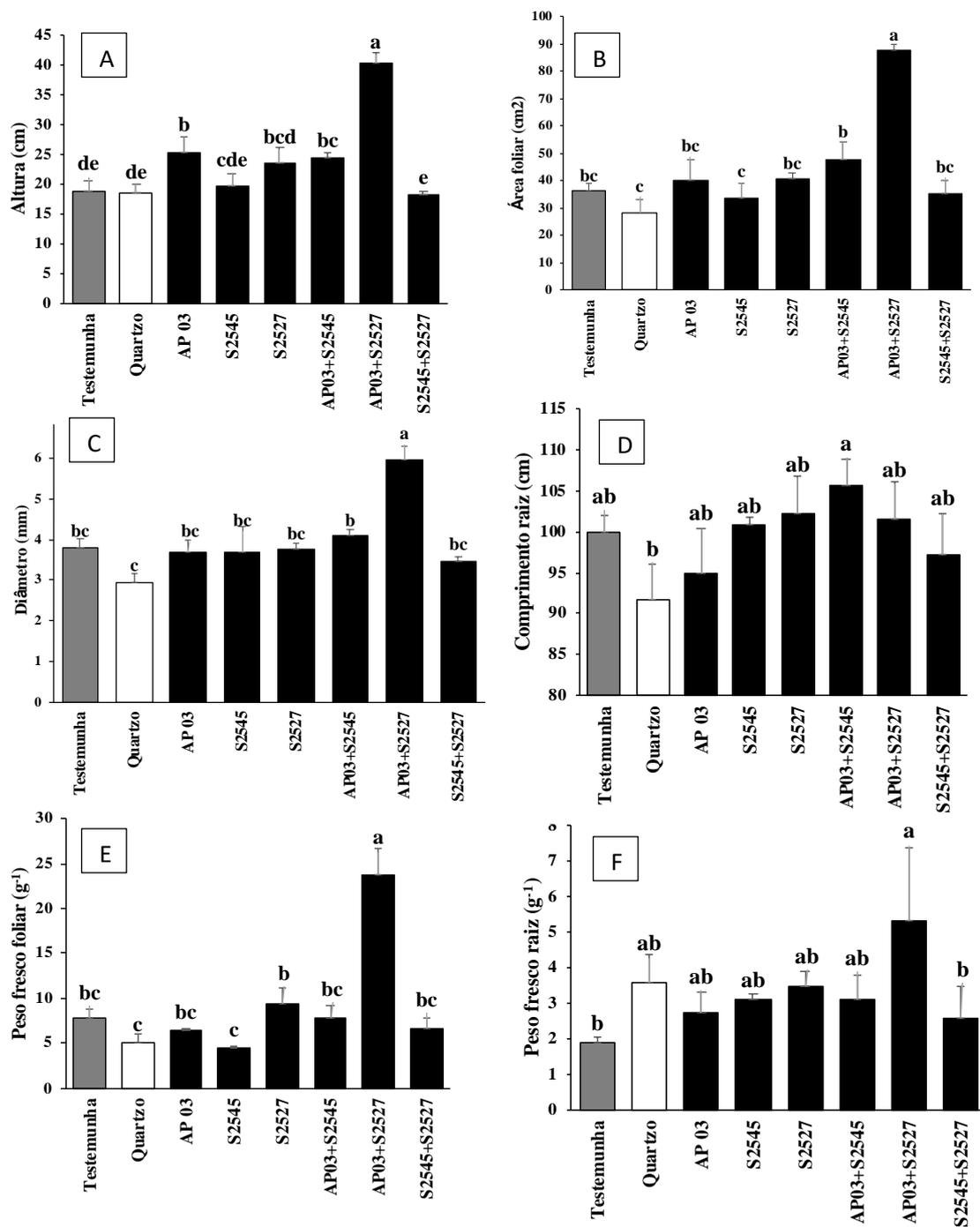
#### **4.6 Efeito da aplicação de isolados de *Bacillus* spp. individualmente e em mistura na promoção de crescimento de plantas de algodão em rizotrons**

A mistura dos isolados de *Bacillus* AP03 + S2527 diferiu estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ) da testemunha e dos demais tratamentos em relação à altura das plantas de algodão desenvolvidas nos rizotrons, com um incremento de 115% na altura das plantas em relação a testemunha (Figura 9 e 10A). Além disso, plantas tratadas com a mistura AP03 + S2527 apresentaram aumento de 144% em área foliar quando comparada com a testemunha, com diferença estatística entre os tratamentos (Figura 9 e 10B). Quanto ao diâmetro, as plantas tratadas com a mistura AP03 + S2527 apresentaram maior diâmetro do caule comparadas a todos os tratamentos (Figura 10C). Com relação ao comprimento de raiz não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 10D), porém plantas tratadas com AP03 + S2527 apresentaram o volume das raízes 36% maior do que a testemunha (Figura 9). O peso fresco de parte aérea e de raízes também foi superior nas plantas tratadas com a mistura AP03 + S2527 (Figura 10E e F), essas plantas apresentam um ganho de 206% quanto ao peso fresco de parte aérea e 182% quanto ao peso fresco de raízes quando comparadas a testemunha.

**Figura 9 - Algodoeiros tratados com isolados de *Bacillus*, separadamente ou em mistura, desenvolvidos em rizotrons, aos 54 dias após semeadura. 1- Testemunha. 2- AP03. 3- S2545. 4- S2527. 5- AP03+S2545. 6- AP03+S2527. 7- S2545+S2527. 8- Quartzzo®**



**Figura 10 - Efeitos de espécies de *Bacillus*, separadamente ou em mistura, na cultivar de algodão FM 975 WS aos 50 dias após semeadura desenvolvidos em rizotrons. A – Altura (cm). B – Área foliar (cm<sup>2</sup>). C- Diâmetro (mm). D- Comprimento de raízes (cm). E- Peso fresco da raiz (g)**



\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

#### 4.7 Colonização de raízes de algodão por *Bacillus* spp.

Dos 14 isolados de *Bacillus* avaliados, 11 (S2527, S2535, S2538, S2545, S2573, AP03, AP115, AP117, AP210, QST 713 e Quartzo (*B. subtilis* + *B. licheniformis*)) colonizaram as raízes. A colonização do rizoplano pode ser visualizada pela formação de uma turbidez de aspecto leitoso, que se forma ao longo das raízes, em consequência do crescimento bacteriano. Esta turbidez está representada por setas na Figura 11. Os isolados S2564, S2543 e S2569 não exibiram colonização de raízes (Figura 12).

Figura 11 - Colonização in vitro de raízes de algodão variedade FM 975 WS por espécies de *Bacillus*. A- Testemunha. B- S2527. C- S2535. D- S2538. E- S2545. F- S2573. G- AP 03. H- AP 115. I- AP 117. J- AP 210. K- QST 713. L- Quartzo®. Setas vermelhas indicam o crescimento bacteriano

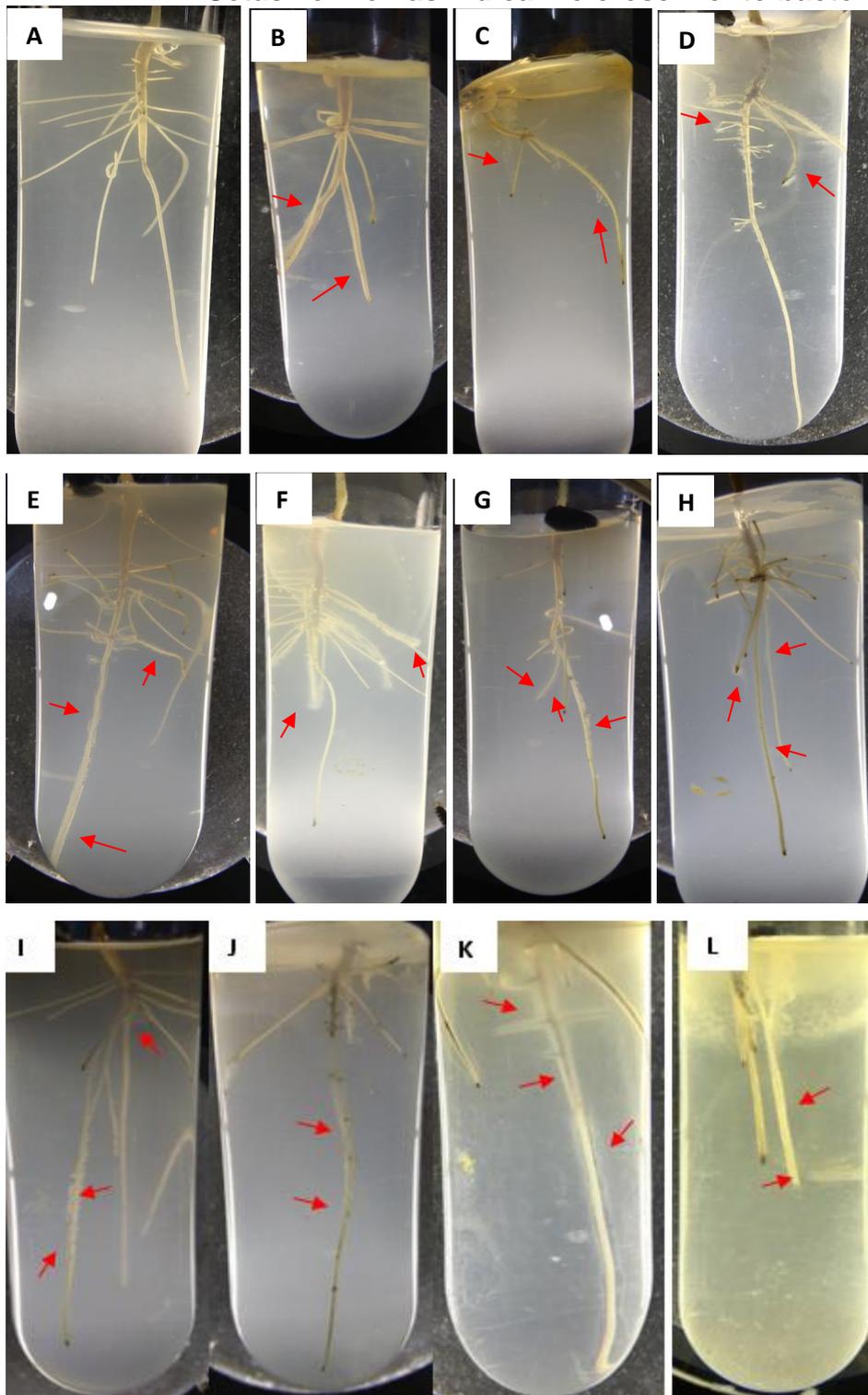
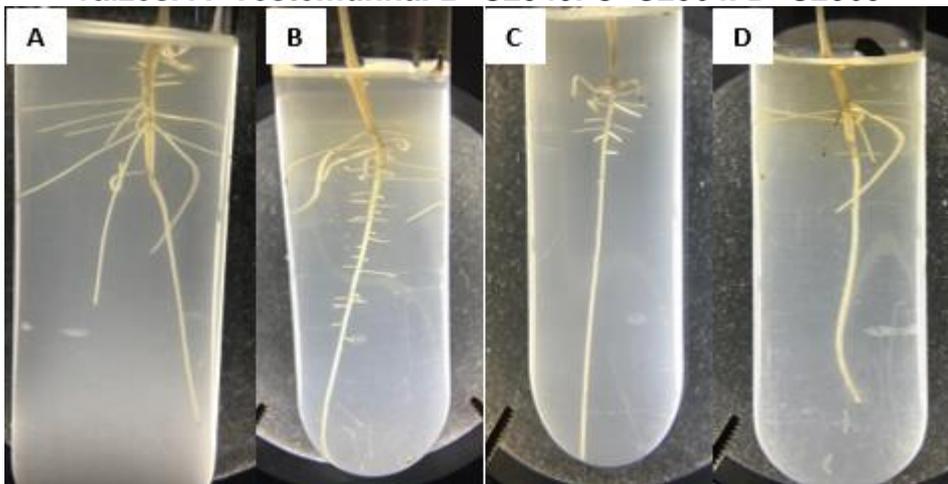


Figura 12 - Isolados de *Bacillus* que não apresentaram colonização *in vitro* de raízes. A- Testemunha. B- S2543. C- S2564. D- S2569



#### 4.8 Controle *in vivo* da murcha de *Fusarium* por *Bacillus* spp.

No decorrer de 80 dias, foram realizados dois ensaios para observar os sintomas de *Fusarium* nas plantas de algodão e selecionar isolados promissores, porém não foi observado sintomas de *Fusarium* em ambos os ensaios e nas duas variedades testadas.

#### 4.9 Efeito de isolados de *Bacillus* sobre a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2)

Inicialmente, os metabólitos de *Bacillus* foram testados *in vitro* com uma concentração de 20%, sendo que nesta concentração os isolados AP 117, S2569, S2530, S2560, S2538, S2527 e o produto comercial Quartzo® exibiram uma mortalidade de J2 de 75 a 100% (Tabela 8). Para a testemunha e o meio de cultura GPL não foram observadas mortes de J2.

**Tabela 8 - Efeito de metabólitos de *Bacillus* na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) a *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4, na concentração de 20%**

Tratamentos	% Mortalidade de J2	Tratamentos	% Mortalidade de J2
H2O	0,0	S2527	97,0
GPL	0,0	S2528	19,0
S2556	27,7	S2529	20,0
S2564	60,0	S2531	5,3
S2532	1,0	S2540	7,7
S2547	12,5	S2553	33,3
S2555	5,0	S2554	4,6
S2550	6,3	S2558	4,5
AP 115	35,2	S2536	9,0
AP 117	100,0	S2571	47,2
S2561	8,0	AP 03	12,0
S2569	96,0	AP 210	30,0
S2568	4,7	S2573	45,0
S2530	100,0	S2557	4,0
S2563	3,4	S2545	17,0
S2549	0,0	S2548	8,2
S2551	0,0	S2552	4,0
S2559	13,3	S2543	9,0
S2562	9,5	S2535	19,0
S2560	100,0	QST 713	11,2
S2538	100,0	Quartzo*	87,0
S2533	5,8		

\*Quartzo® (*B. subtilis* + *B. licheniformis*)

Com os oito isolados pré-selecionados nesse teste mais as espécies de *Bacillus* antagônicas a *Fusarium in vitro* (selecionadas de acordo com a inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* por isolados de *Bacillus*), avaliou-se também o efeito da concentração dos metabólitos a 16% na mortalidade de J2. Onze isolados de *Bacillus* diferiram estatisticamente da testemunha com elevadas porcentagens de mortalidade de J2, sendo que o isolado AP 117 causou 100% de mortalidade de J2, seguido do isolado S2527 com 67,1% e do produto comercial Quartzo® com 59,7% (Tabela 9), mostrando que esses isolados apresentaram um maior efeito nocivo aos J2. Para a testemunha e o meio de cultura GPL não foram observadas mortes de J2.

**Tabela 9 - Efeito de metabólitos de *Bacillus* na mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) a *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4, na concentração de 16%**

Tratamentos	% Mortalidade de J2
GPL	0 g
H2O	0 g
S2560	0 g
S2543	0 g
S2530	1,77 g
S2557	3,35 g
S2552	4,48 g
S2548	4,68 g
AP 210	5,54 f
AP 03	6,19 f
S2538	6,88 f
S2545	10,43 e
S2569	11,52 e
QST 713	14,72 d
S2564	16,92 d
S2573	30,49 c
Quatzo*	59,70 b
S2527	67,10 b
AP 117	100 a
CV(%)	18,83

\*Quatzo® (B. subtilis + B. licheniformis)

\*\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

#### **4.10 Seleção de isolados de *Bacillus* com metabólitos termoestáveis tóxicos a *M. incognita* raças 3 e 4, *in vitro***

Não foram observados efeitos dos metabólitos termoestáveis sobre *M. incognita* raças 3 e 4 na concentração de 20% *in vitro*.

#### **4.11 Efeito de *Bacillus* spp. sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita* raça 3**

Na avaliação aos sete dias após montagem das câmaras de eclosão, todos os isolados de *Bacillus* diferiram estatisticamente da testemunha, apresentando valores

de porcentagem de eclosão de J2 inferiores à testemunha, com exceção do produto comercial Quartzo<sup>®</sup>, o qual exibiu porcentagem de eclosão maior do que a testemunha (118,29%) (Tabela 10). Dentre todos os isolados, S2527, S2528, S2530, S2543, S2545, S2547, S2554, S2557, S2560, S2563, S2564, S2569, AP03, AP115 e AP 210 exibiram valores menores de porcentagem de eclosão aos 7 dias. O produto químico cadusafós (Rugby<sup>®</sup>) apresentou o menor valor relativo da porcentagem de eclosão (13,19%), mas não diferindo estatisticamente dos isolados S2527, S2528, S2530, S2543, S2545, S2547, S2554, S2557, S2560, S2563, S2564, S2569, AP03, AP115 e AP 210. Aos 14 dias após do início do experimento os isolados S2527 e AP 03 apresentaram as menores porcentagens de eclosão de J2 (3,56 e 5,08, respectivamente). Aos 21 dias, todos os isolados diferiram da testemunha reduzindo a eclosão de J2, porém os isolados S2557, S2564, S2569 e AP 03 foram os que apresentaram as menores taxas de eclosão de J2. Com 28 dias após montagem das câmaras de eclosão, 19 isolados de *Bacillus* e cadusafós se sobressaíram dos demais, apresentando porcentagem de eclosão menor que 10% quando comparados à testemunha. Com relação a área abaixo da curva de progresso da eclosão (AACPE), todos os tratamentos apresentaram valores inferiores a testemunha, porém os isolados S2527, S2557, S2569 e AP 03 foram os que exibiram as menores AACPE diferindo da testemunha e dos demais tratamentos, inclusive o tratamento químico. Esses quatro isolados reduziram drasticamente a eclosão de J2, demonstrada pelos menores valores de AACPE (Tabela 10). Além disso, esses isolados apresentaram efeito nocivo já na primeira semana afetando as fases do desenvolvimento embrionário e desse modo, reduzir ou retardar a eclosão de juvenis de segundo estágio.

**Tabela 10 - Porcentagem de eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* aos 7, 14, 21 e 28 dias, e área abaixo da curva de progresso da eclosão (AACPE) sob efeito de espécies de *Bacillus* spp**

Tratamentos	% Eclosão				AACPE **
	7 dias *	14 dias *	21 dias *	28 dias *	
AP 03	21,70 d	5,08 e	4,85 e	7,67 e	172,39 h
S2527	22,12 d	3,56 e	8,6 d	5,37 e	181,55 h
S2557	15,74 d	11,95 d	4,85 e	4,09 e	187,10 h
S2569	18,72 d	11,19 d	3,23 e	5,88 e	187,13 h
S2560	19,57 d	9,16 d	9,16 d	4,85 e	213,79 g
S2530	15,74 d	10,17 d	8,08 d	11,25 d	222,34 g
QST 713	27,23 c	7,88 d	7,54 d	6,64 e	226,64 g
S2528	22,97 d	10,43 d	9,70 d	6,90 e	245,54 g
S2563	20,00 d	13,99 c	7,27 d	7,67 e	245,76 g
S2545	24,25 d	13,23 c	7,00 d	6,90 e	250,74 g
S2543	18,29 d	16,53 c	9,70 d	5,62 e	267,43 f
S2564	20,00 d	18,32 c	6,46 e	7,67 e	270,38 f
S2547	19,57 d	17,04 c	9,16 d	7,41 e	277,95 f
S2559	25,53 c	13,74 c	9,70 d	7,16 e	278,53 f
S2556	25,95 c	13,74 c	9,16 d	8,18 e	279,83 f
S2535	29,78 c	10,94 d	10,78 c	6,96 e	280,71 f
S2558	24,68 c	10,43 d	11,97 c	12,02 d	285,29 f
S2533	27,65 c	7,63 d	14,01 c	11,50 d	288,63 f
AP 115	17,87 d	15,26 c	12,93 c	9,71 e	294,00 f
Rugby	13,19 d	16,74 c	15,47 c	7,67 e	298,52 f
AP 210	21,27 d	18,06 c	7,54 d	15,60 c	308,36 e
AP 117	28,93 c	12,46 c	11,85 c	12,27 d	314,54 e
S2561	33,61 c	10,17 d	12,12 c	11,76 d	314,98 e
S2554	22,12 d	17,30 c	10,51 c	14,06 d	321,38 e
S2531	34,04 c	14,50 c	11,85 c	8,69 e	334,13 e
S2562	32,34 c	17,81 c	10,51 c	8,43 e	340,99 e
S2550	28,93 c	16,79 c	13,20 c	9,20 e	343,51 e
S2538	33,61 c	18,06 c	9,70 d	10,48 d	348,74 e
S2553	27,23 c	16,15 c	16,44 c	10,23 d	359,29 e
S2555	43,40 b	12,97 c	11,32 c	15,08 c	374,81 d
S2568	33,61 c	18,06 c	12,93 c	18,67 c	400,03 d
S2532	54,04 b	16,53 c	16,98 c	12,78 d	468,55 c
S2573	51,06 b	27,48 c	15,90 c	19,94 c	552,23 c
Quartzo	118,29 a	72,26 b	49,86 b	43,73 b	1422,02 b
GPL	88,51 a	96,94 a	101,34 a	100,00 a	2047,85 a
H2O	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	2100,00 a
CV (%)	11,82	10,13	10,93	10,95	2,17

\*Dados transformados para raiz(x+0,5).

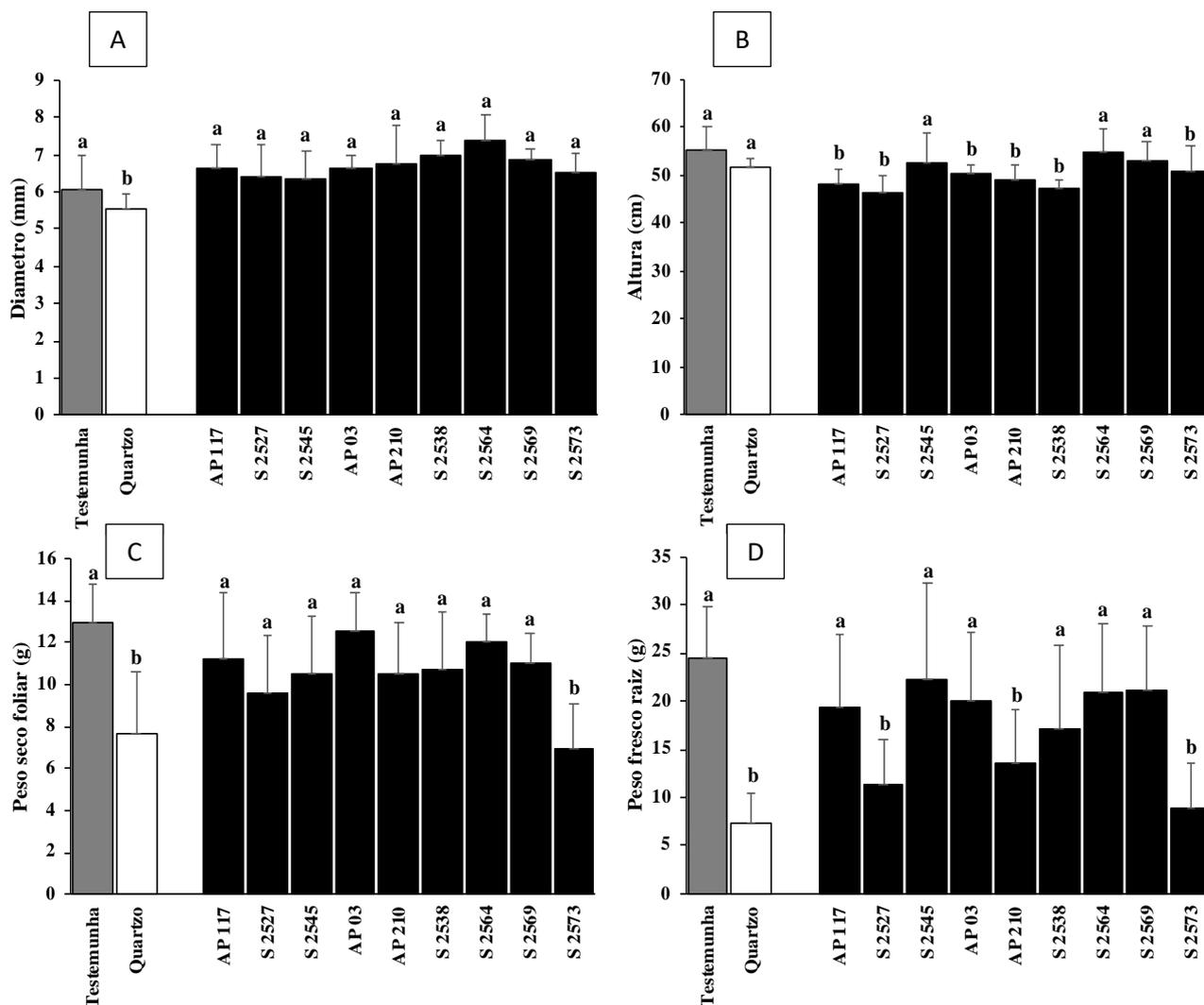
\*\*Dados transformados para log(x).

\*\*\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05 probabilidade).

#### 4.12 Seleção de isolados de *Bacillus* spp. antagônicos a *M. incognita* raças 3 e 4 *in vivo*

Na cultivar FM975 WS, aos 100 dias após semeadura, ao avaliar o diâmetro das plantas, observou-se que apenas o tratamento com Quartzo<sup>®</sup> diferiu significativamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ), apresentando um valor inferior (5,4 mm) quando comparado a testemunha (6,2 mm) (Figura 13A). Os nove isolados de *Bacillus* não diferiram da testemunha com relação ao diâmetro da planta ( $P \leq 0,05$ ). Ao avaliar a altura das plantas, nenhum tratamento foi superior a testemunha, porém os isolados AP 117, S2527, S2545, AP 03, AP 210, S2538 e S2573 apresentaram valores de altura inferiores a testemunha (Figura 13B). Para o peso seco da parte aérea e do sistema radicular nenhum isolado apresentou valores superiores a testemunha (Figura 13CD).

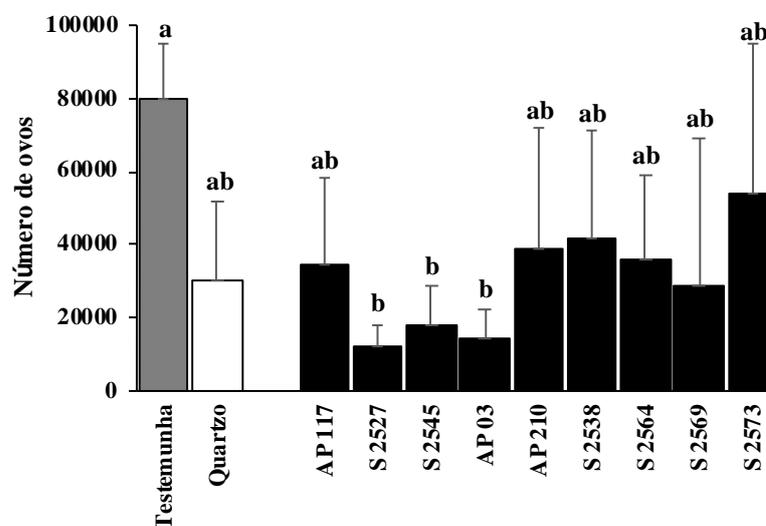
**Figura 13 - Efeitos in vivo de isolados de *Bacillus* na cultivar de algodão FM 975 WS aos 100 dias após semeadura desenvolvidas em substratos infestados com *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4. A – Diâmetro(mm). B – Altura (cm). C- Peso seco foliar (g). D- Peso fresco da raiz (g)**



\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

Os isolados S2527, S2545 e AP 03 apresentaram os menores números de ovos por planta quando comparados a testemunha (Figura 14). Esses isolados diferiram estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com reduções de 85%, 77% e 82% quando comparados a testemunha. Além disso, os três isolados também reduziram o fator de reprodução de 13 para 2, 3 e 2,4, respectivamente, destacando-se dos demais isolados como os melhores tratamentos na redução de ovos.

**Figura 14 - Efeitos *in vivo* de espécies de *Bacillus* sob o número de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3 e 4 na cultivar de algodão FM 975 WS, aos 100 dias**



Para a cultivar IMA 7501 WS, ao realizar a extração e contagem do número de ovos da testemunha aos 100 dias, o fator de reprodução permaneceu próximo de 1 em todas as repetições. Desse modo, essa cultivar é considerada moderadamente resistente, não sendo uma boa cultivar replicadora de nematoides e, portanto, não encontraria diferença entre os tratamentos.

#### **4.13 Controle *in vivo* do complexo *Fusarium*-nematóide por *Bacillus* spp., sob cultivo protegido**

Aos 60 dias da semeadura da cultivar de algodão FM975WS foi avaliado parâmetros de altura, índice SPAD, área foliar, peso fresco e seco da parte aérea e do sistema radicular para verificar efeitos de isolados de *Bacillus* inoculados em plantas conduzido em quatro grupos com diferentes composições de inóculo e infestação no solo. No solo sem infestação de *Fusarium* e inoculação de nematoides, aos 60 dias da semeadura, o isolado S2545 exibiu a maior altura de 61,9 cm, diferindo estatisticamente dos demais isolados e da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) (50,9 cm) (Figuras 15 e 16A). Em relação a área foliar do algodão, todos os isolados de *Bacillus* testados, exceto a mistura AP03+S2545, diferiram estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ), esses isolados exibiram valores de área foliar 45% superior à testemunha (Figura 15 e 16B). Para o índice SPAD, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P$

$\leq 0,05$ ) (Figura 16C). Com relação ao peso fresco e seco da parte aérea, apenas o isolado S2545 se destacou, diferindo estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ), com 66,8 g e 13,3 g (Figuras 16DF) enquanto que a testemunha apresentou 45,1 g e 8,3 g, respectivamente. Portanto, com ganho de peso fresco foliar de 47% e 60% de peso seco comparados com a testemunha. Do mesmo modo, para peso fresco e seco do sistema radicular o isolado S2545 apresentou os maiores valores, com 12,48 g e 3,45 g, respectivamente, diferindo estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com 7,24 g e 1,58 g, respectivamente (Figuras 16EG). Além disso, a mistura de AP03 + S2545, AP03 e Rugby® apresentaram valores superiores a testemunha, na ordem de 52%, 52% e 57%, respectivamente, com diferença estatística para peso seco de raiz ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 16G).

**Figura 15 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**

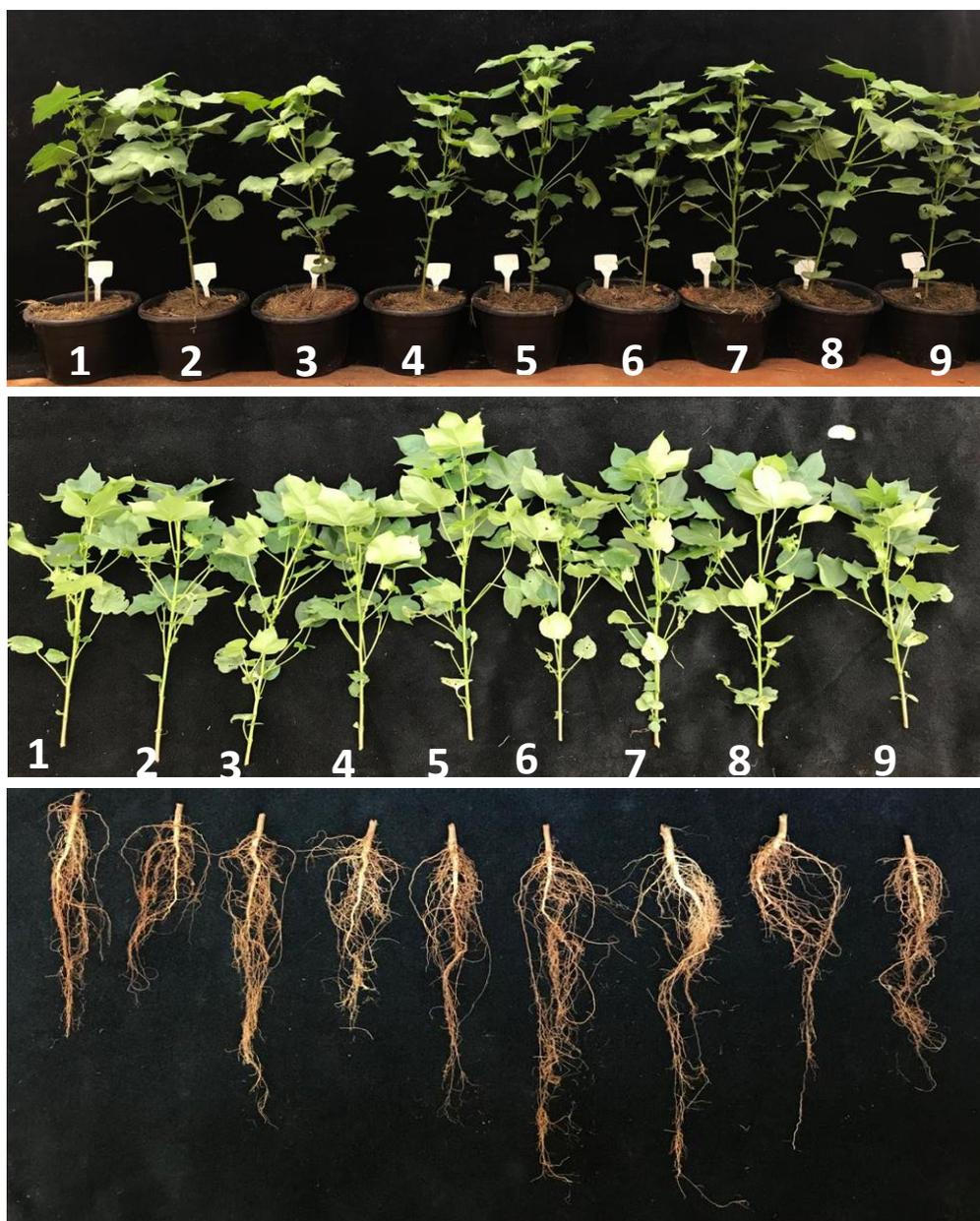
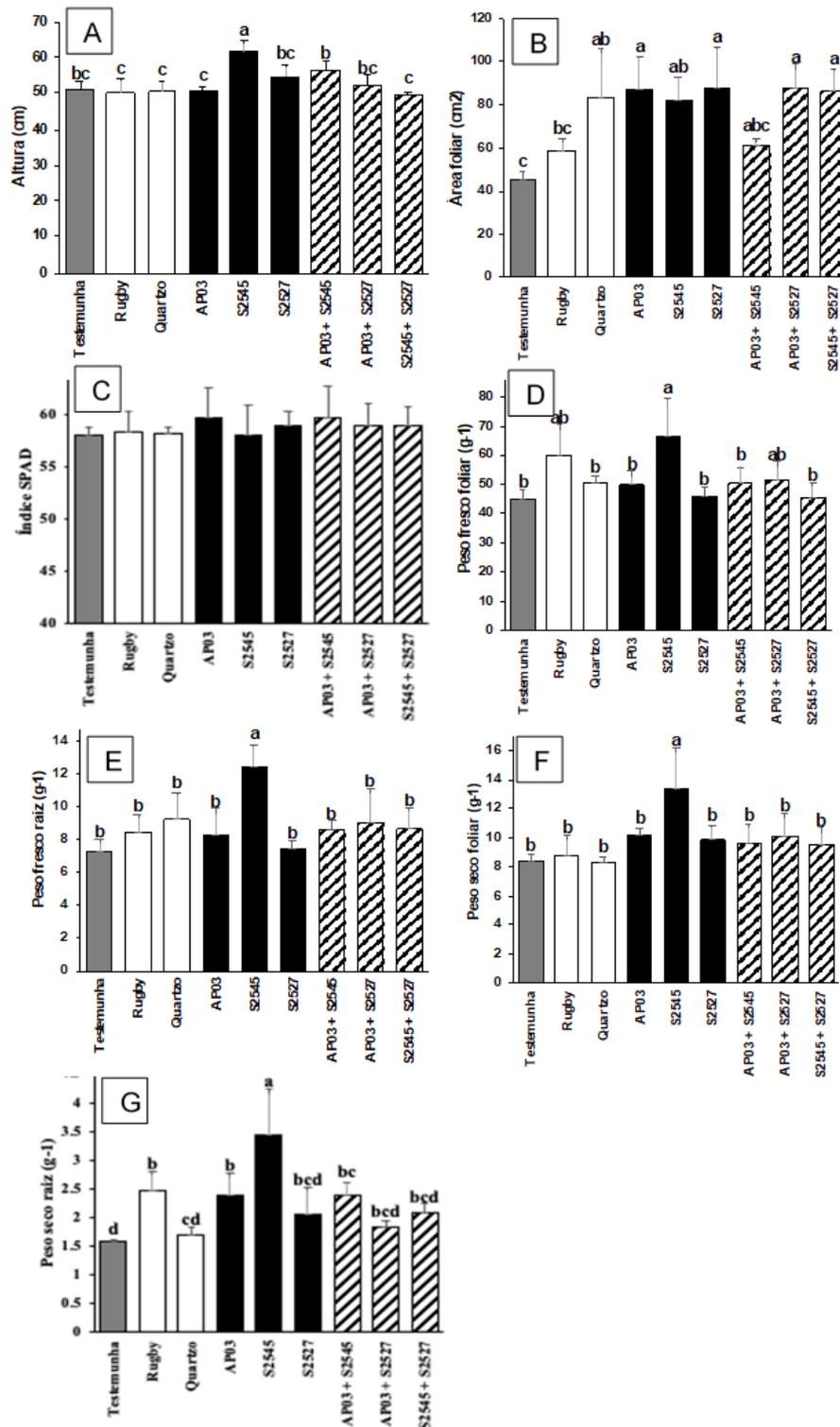


Figura 16 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) - B; índice SPAD - C; peso fresco e seco (g) da parte aérea - DF - e do sistema radicular - EG de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



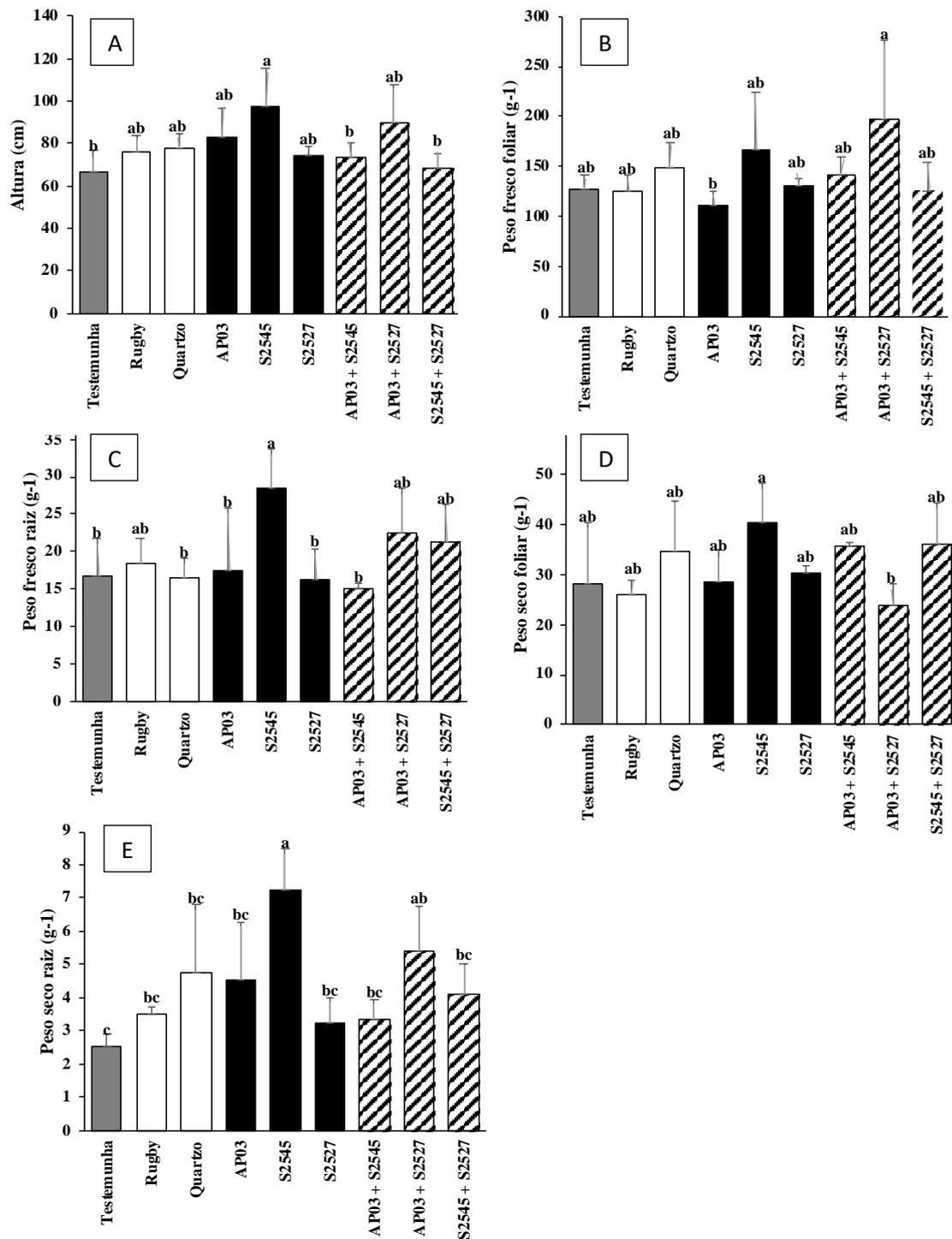
\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

Aos 120 dias, nos solos sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoide, o isolado S2545 promoveu o aumento da altura (97,7 cm) com diferença estatística quando comparado à testemunha ( $P \leq 0,05$ ) (66,8 cm) (Figuras 17 e 18A). Com relação ao peso fresco e seco da parte aérea não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ) quando comparados com a testemunha, contudo a mistura AP03+S2527 apresentou o peso fresco 34% maior (Figura 18 B). O isolado S2545 apresentou o maior peso fresco do sistema radicular raiz (28,5 g) entre os tratamentos, diferindo da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) (Figuras 17 e 18C). O isolado S2545 e a mistura AP03+S2527 apresentaram diferenças estatísticas ( $P \leq 0,05$ ) quando comparados à testemunha e exibiram os maiores valores para peso seco de raiz, 7,25 g e 5,38 g, respectivamente (Figuras 17 e 18E), com aumentos de 183% e 110%, respectivamente, quando comparados com a testemunha.

**Figura 17 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



**Figura 18 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; peso fresco e seco (g) da parte aérea - BC - e do sistema radicular - DE de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo sem infestação de *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

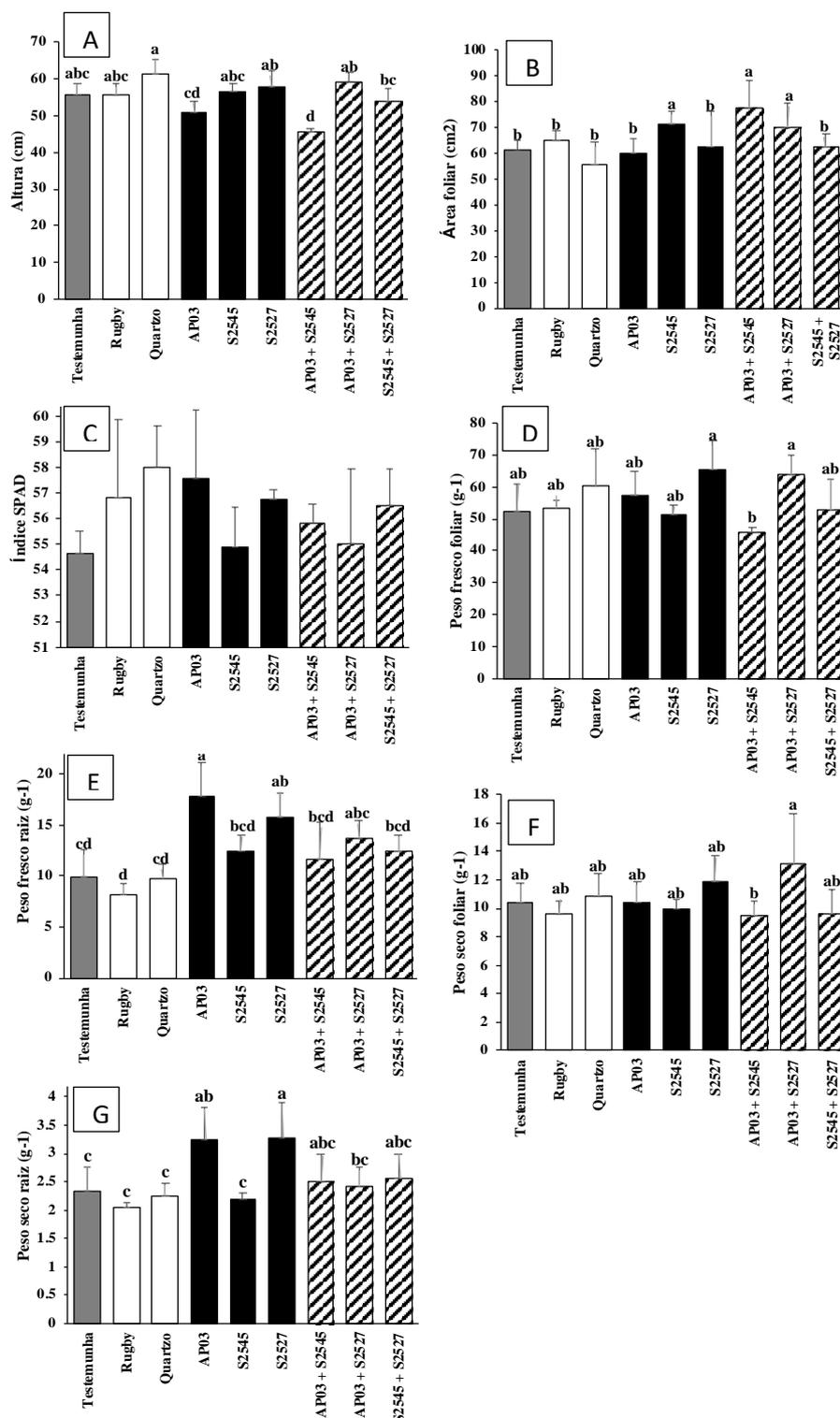
Em solos apenas com infestação de *Fusarium*, aos 60 dias da semeadura, houve diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) para a altura, sendo que a mistura de isolados AP03+S2545 apresentou a menor altura entre todos os tratamentos, com valor de 45,6 cm. Os demais isolados apresentaram valores semelhantes à testemunha (Figuras 19 e 20A). As misturas de *Bacillus* AP03+S2545, AP03+S2527 e o isolado S2545 exibiram os maiores valores de área foliar, com incrementos de 27%, 14% e 17%, respectivamente, em relação à testemunha (Figuras 19 e 20B). O índice SPAD foi semelhante entre todos os isolados avaliados (Figura 20C). Para o peso fresco e seco da parte aérea não foram observados efeitos dos isolados em relação à testemunha (Figura 20DF). Porém, o isolado S2527 aumentou em 24% o peso fresco e 11% o peso seco, e a mistura AP03+S2527 apresentou aumento de 22% para o peso fresco e 24% para o peso seco, em relação a testemunha (Figura 20DF). Os isolados AP03 e S2527 exibiram os maiores pesos frescos e secos do sistema radicular com aumentos de 79% e 58%, respectivamente para o peso fresco, e 39% e 39% para o peso seco, em relação a testemunha (Figuras 19, 20 EG).

Aos 120 dias após semeadura, em solos infestado com *Fusarium* apenas, o isolado S2545 e a mistura S2545+S2527 apresentaram 67 cm e 66 cm, respectivamente, diferindo da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com 90 cm (Figuras 21 e 22A). Quanto ao peso fresco foliar, o isolado S2527 apresentou aumento de 80% em relação ao peso fresco da testemunha (Figura 22B). Não houve diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para os pesos frescos e secos do sistema radicular. Quanto ao peso seco de parte aérea, não houve diferença estatística dos isolados com a testemunha ( $P \leq 0,05$ ). No entanto, o isolado AP03 aumentou o peso seco de plantas tratadas em 17% (Figura 22D).

Figura 19 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



**Figura 20 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) - B; índice SPAD - C; peso fresco e seco (g) da parte aérea - DF - e do sistema radicular - EG de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**

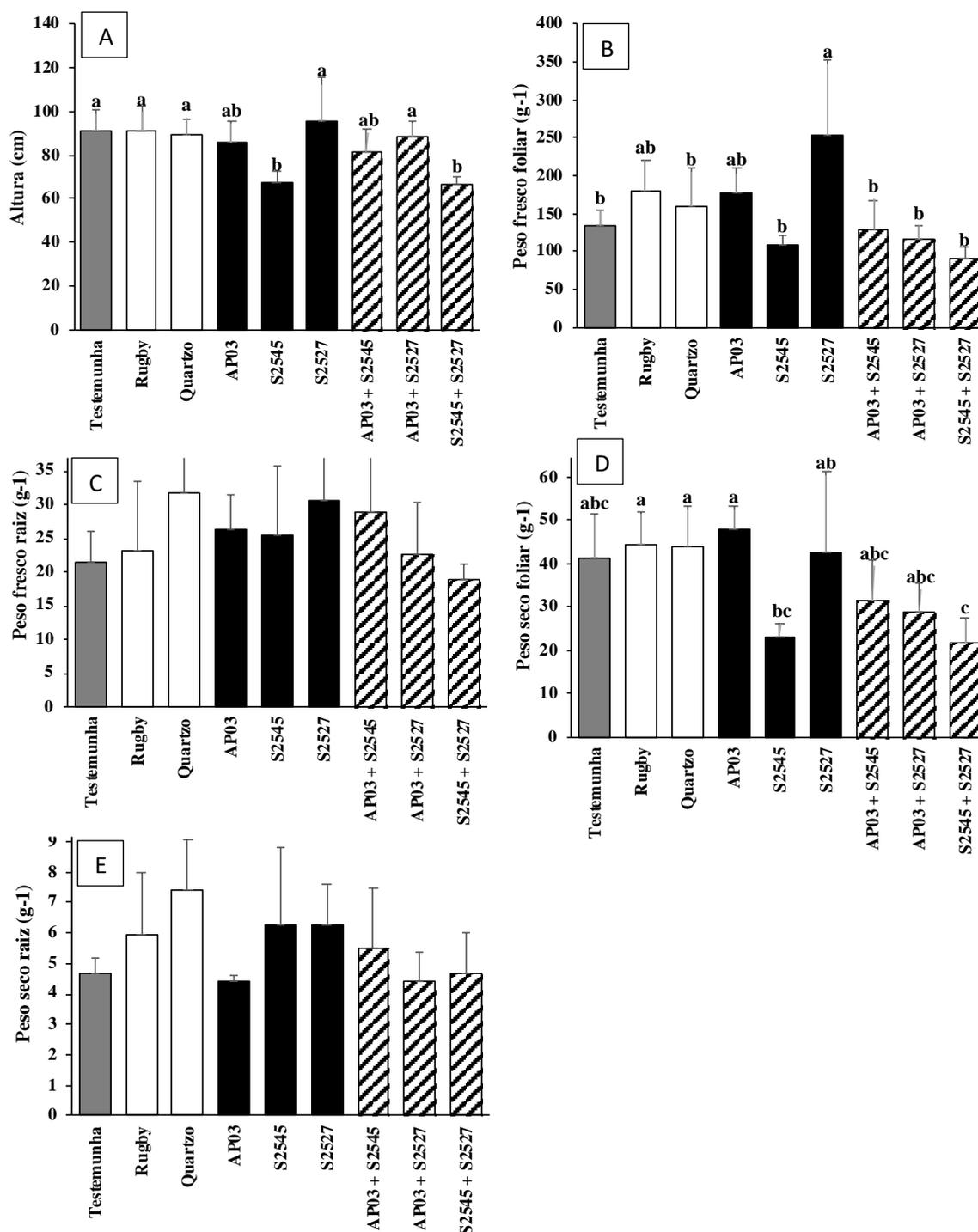


\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

Figura 21 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



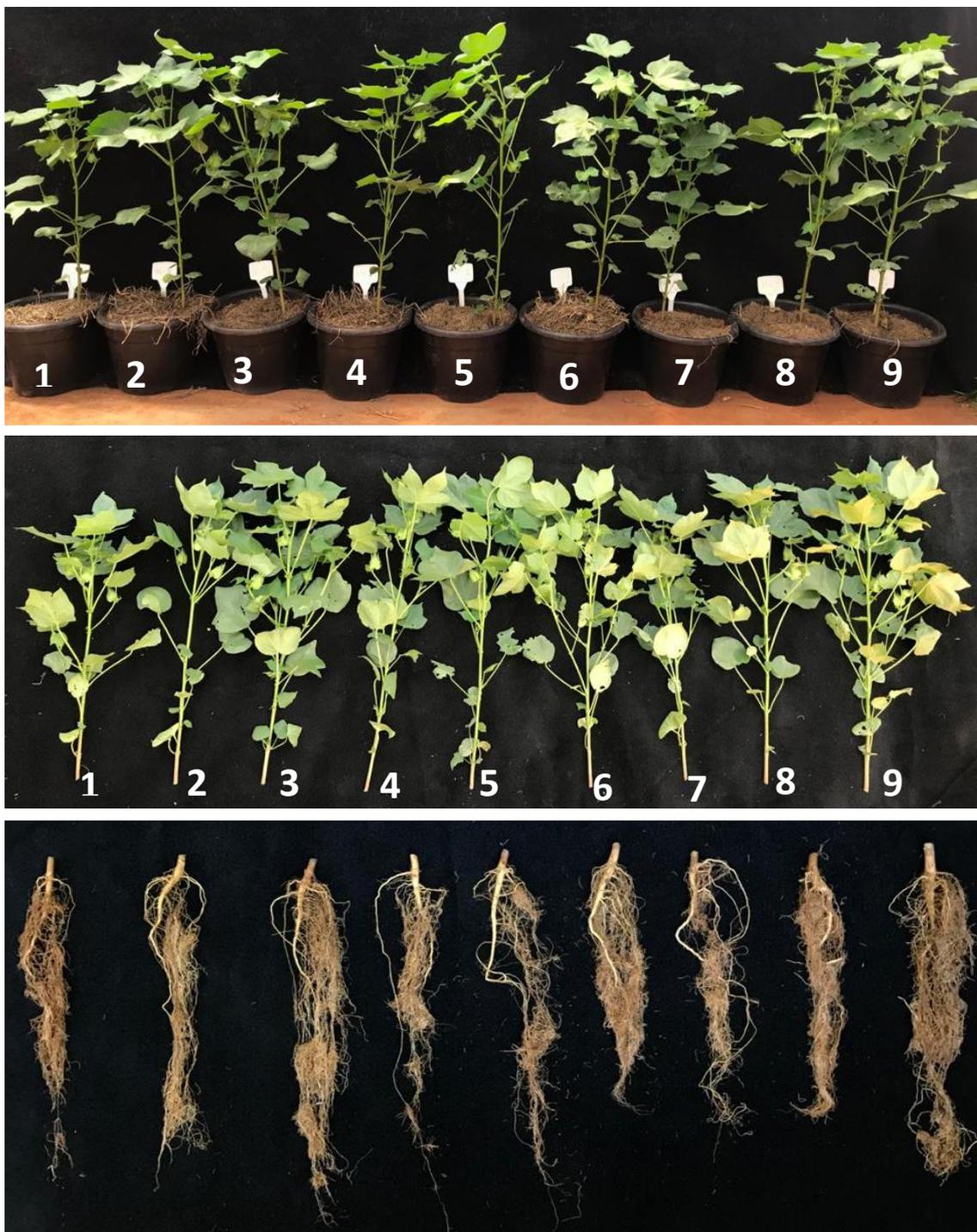
**Figura 22 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; peso fresco e seco (g) da parte aérea - BC - e do sistema radicular - DE de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e sem inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



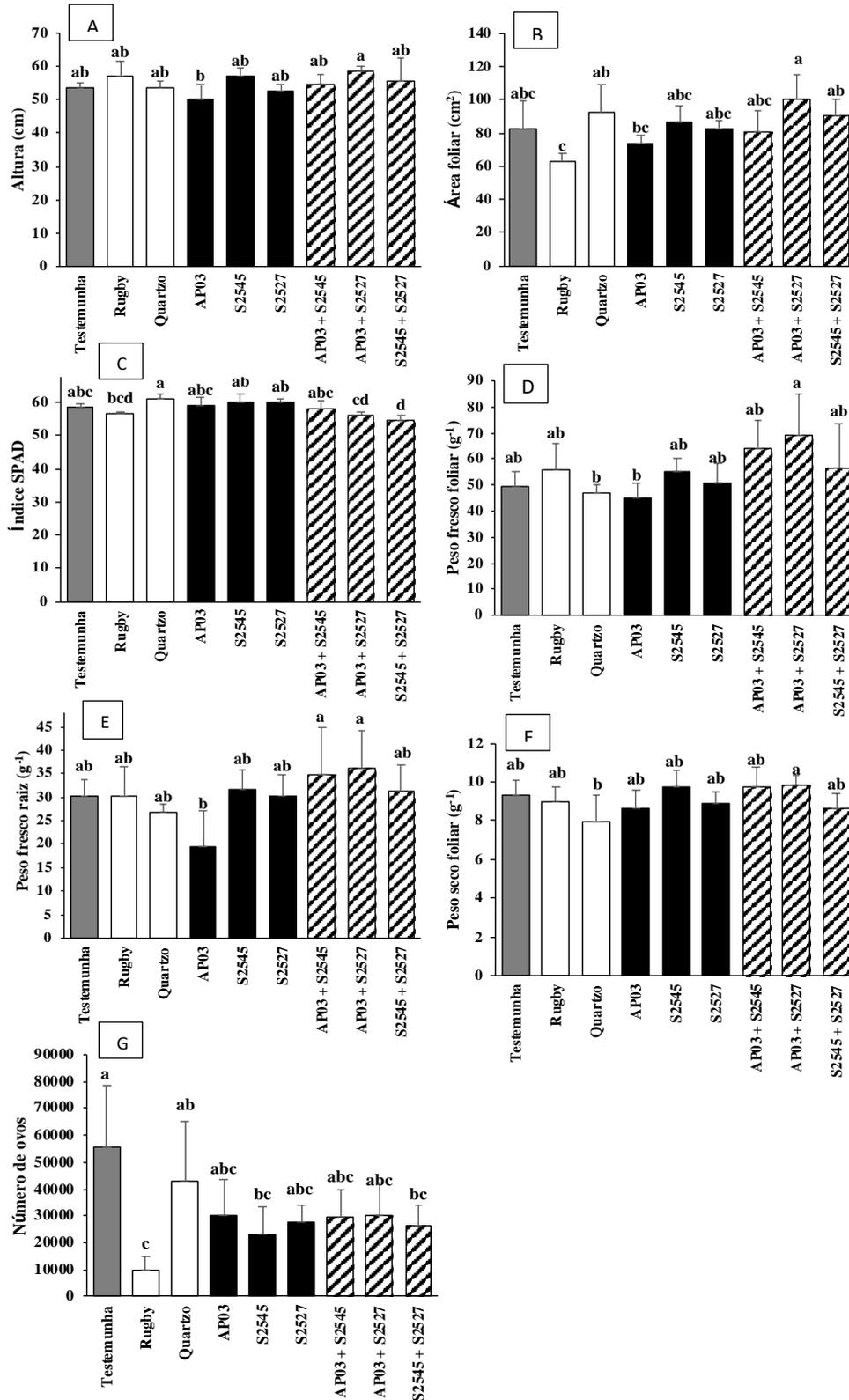
\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

Em solos com inoculação apenas de nematoides, aos 60 dias após a semeadura, as plantas tratadas com *Bacillus* não diferiram da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com relação a altura e a área foliar. No entanto, plantas tratadas com a mistura de isolados AP03+S2527 exibiram incrementos de 9% e 22%, respectivamente, quando comparados com a testemunha para altura e área foliar (Figuras 23, 24AB). Com relação aos pesos frescos e secos da parte aérea, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ) quando comparados com a testemunha. Para o peso fresco do sistema radicular, nenhum isolado diferiu da testemunha ( $P \leq 0,05$ ). Entretanto, plantas tratadas com a mistura AP03+S2527 exibiram um aumento superior a 19% quando comparadas a testemunha (Figuras 23 e 24E). Ao analisar o número médio de ovos de *M. incognita* por planta, três tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 24G). O menor número de ovos foi exibido por plantas tratadas com o nematicida químico Rugby<sup>®</sup>, o qual proporcionou uma redução de ovos de 82% comparado a testemunha e um fator de reprodução de 1,6. Além disso, os tratamentos com S2545 e a mistura S2545+S2527 também diferiram da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com redução do número de ovos de 59% e 54%, respectivamente. As plantas tratadas com os isolados S2545 e S2545+S2527 não apresentaram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) das tratadas com o nematicida químico Rugby<sup>®</sup> (Figura 24G), proporcionando um fator de reprodução de 3,89 e 4,34, respectivamente, enquanto o fator de reprodução da testemunha foi 9,3.

Figura 23 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides mas sem infestação de *Fusarium*, aos 60 dias após sementeira. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



**Figura 24 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; área foliar (cm<sup>2</sup>) - B; índice SPAD - C; peso fresco e seco (g) da parte aérea - DF - e do sistema radicular - E e número de ovos de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides e sem infestação de *Fusarium*, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



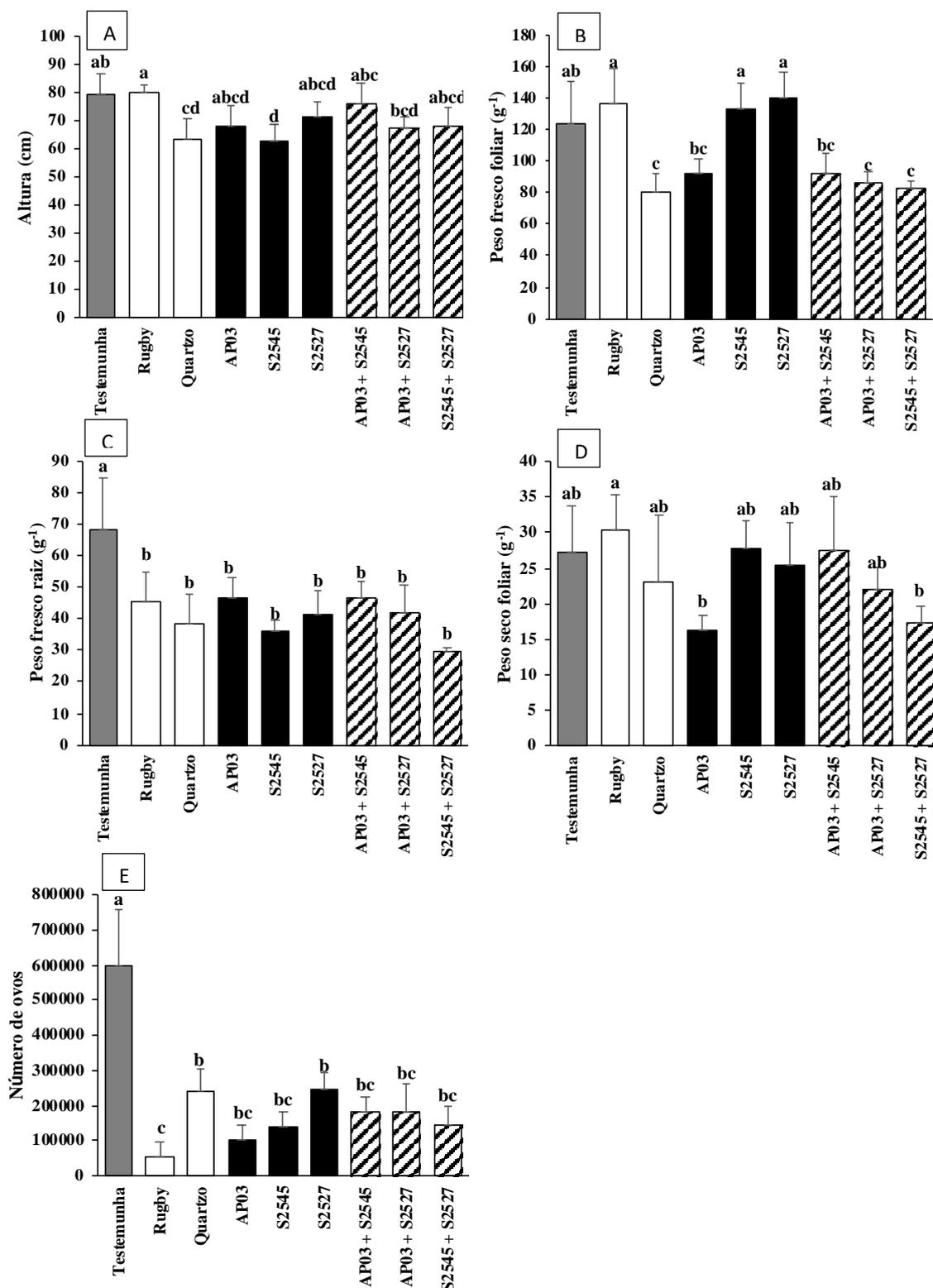
\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

Aos 120 dias da semeadura, em solos com inoculação apenas de nematoides, os tratamentos com Quartzo<sup>®</sup>, S2545 e AP03+S2527 exibiram uma redução de altura de plantas na ordem de 19,7%, 20,5% e 16,6%, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 26A). Para o peso fresco da parte aérea também apresentaram redução em relação à testemunha as plantas tratadas com Quartzo<sup>®</sup>, AP03, AP03+S2527 e S2545+S2527, com reduções na ordem de 35%, 26%, 30% e 33%, respectivamente (Figura 26B). Por outro lado, as plantas tratadas com Rugby<sup>®</sup> e com os isolados S2545 e S2527 não apresentaram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) quando comparados a testemunha. As plantas tratadas com os isolados de S2545 e S2527 tiveram um ganho de peso fresco da parte aérea (Figuras 25 e 26B). O peso fresco do sistema radicular foi superior na testemunha em relação aos demais tratamentos (Figuras 25 e 26C). Não houve diferença estatística dos tratamentos ( $P \leq 0,05$ ) comparados com a testemunha para peso seco foliar (Figura 26D). Com relação ao número médio de ovos de *M. incognita* por planta, todos os tratamentos reduziram o número de ovos por planta, em relação à testemunha (Figura 26E). As plantas tratadas com o nematicida químico Rugby<sup>®</sup> exibiram redução do número de ovos por planta de 90% e um fator de reprodução de 10, enquanto a testemunha apresentou um FR de 99. As plantas tratadas com os isolados AP03, S2545, AP03+S2545, AP03+S2527 e S2545+S2527 exibiram redução de 83%, 76%, 69%, 69% e 75%, respectivamente, e não diferiram do tratamento químico Rugby<sup>®</sup> ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 26E), com valores de FR na ordem de 16, 23, 30, 30, 24, respectivamente.

Figura 25 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo com inoculação de nematoides mas sem infestação de *Fusarium*, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



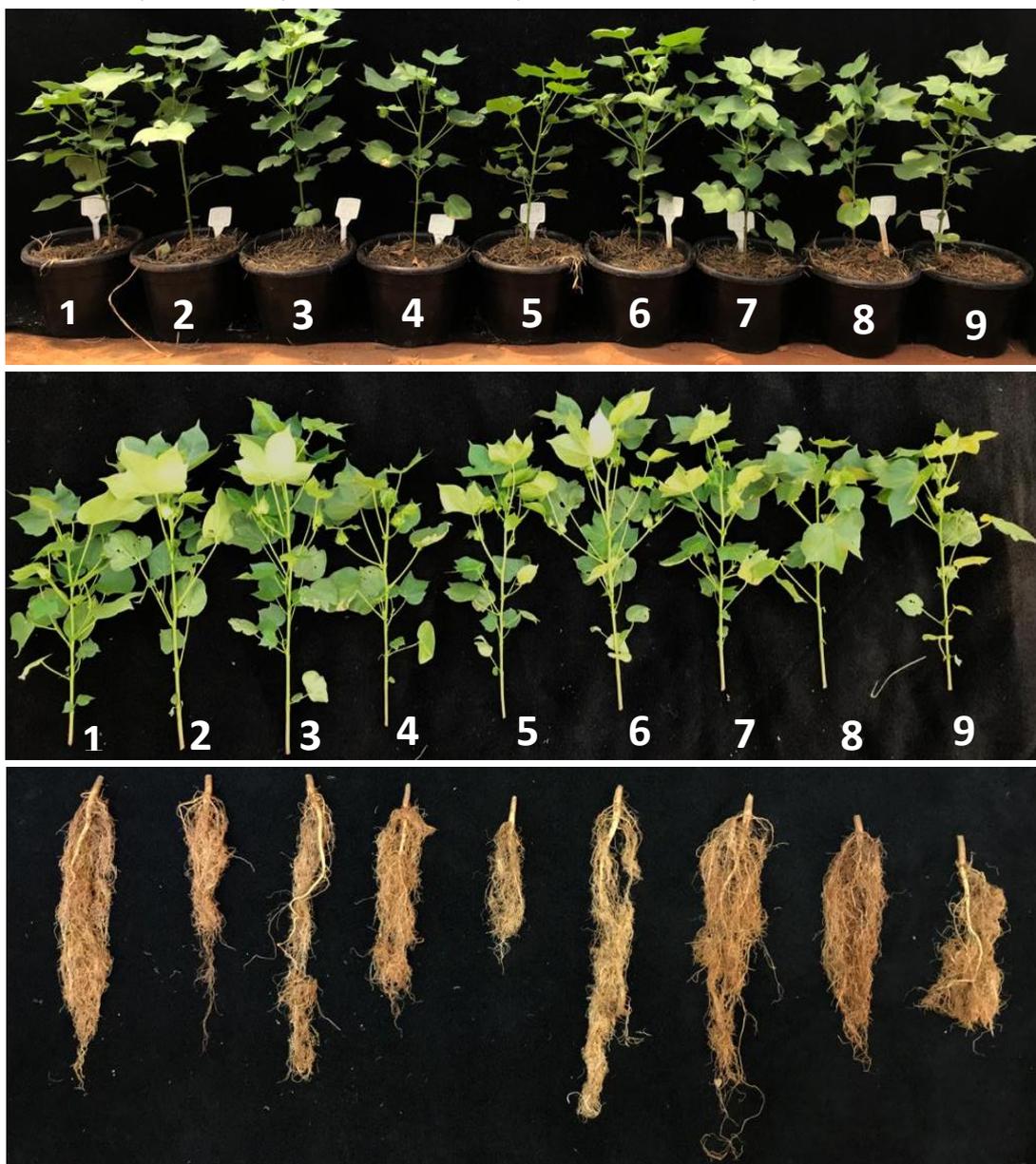
**Figura 26 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) - A; pesos frescos e secos (g) da parte aérea e do sistema radicular – BCD e número de ovos (E) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em inoculas com nematoides, mas sem infestação com *Fusarium*, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



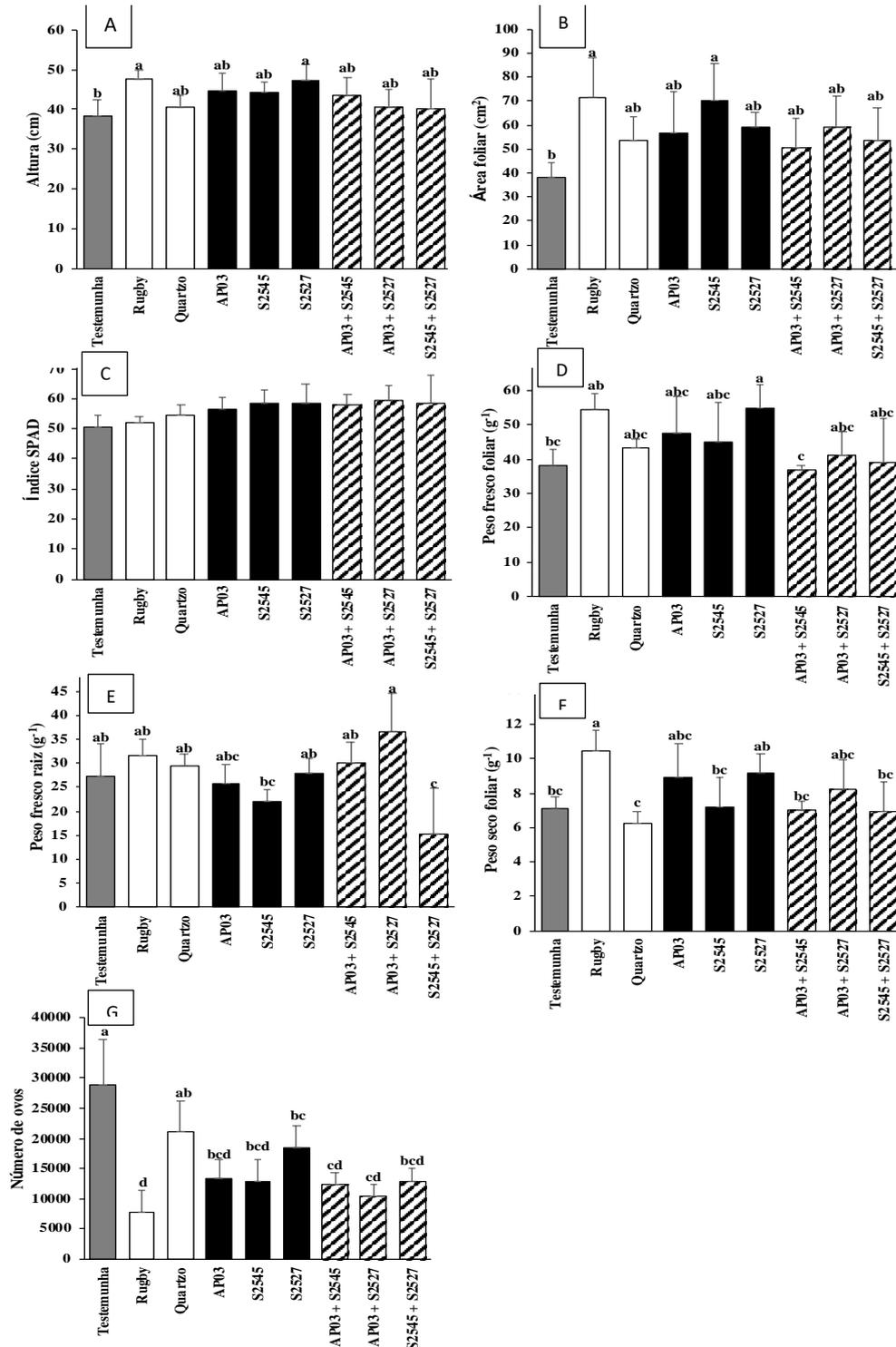
\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade).

Para o grupo 4, cujas plantas se desenvolveram em solos com infestação de *Fusarium* e com inoculação de nematoides, as plantas, após 60 dias da semeadura, tratadas com o nematicida químico Rugby® e com o isolado S2527 diferiram estatisticamente da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) com relação a altura de plantas (Figuras 27 e 28A), apresentando um aumento de 24% e 23%, respectivamente. A área foliar apresentou incremento de 81% e 89% nas plantas tratadas com o isolado S2527 e o nematicida químico Rugby® (Figura 28B), respectivamente, quando comparados à testemunha. Com relação ao índice SPAD, não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 28C). As plantas tratadas com o isolado S2527 apresentaram o peso fresco de parte aérea 43% maior do que a testemunha (Figura 28D). O peso fresco do sistema radicular foi incrementado com a mistura AP03+S2527 em 34% (Figuras 27 e 28E). Para o peso seco da parte aérea, o tratamento com o nematicida químico Rugby® diferiu da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) e o isolado S2527 mesmo sem exibir diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) proporcionou aumento de 31,4% quando comparado à testemunha (Figura 28F). Todos os tratamentos, exceto o bionematicida Quartzo®, diminuíram o número de ovos por planta e diferiram da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 28G). A maior redução de ovos por planta foi observada com a aplicação do nematicida químico Rugby®, com redução de 73% comparado a testemunha. Os tratamentos AP03+S2527, AP03+S2545, S2545+S2527, S2545 e AP03 apresentaram redução do número de ovos por planta em 63%, 57%, 55%, 55% e 53%, respectivamente, com fator de reprodução de 1,73, 2,06, 2,16, 2,13 e 2,23, respectivamente, quando comparados ao fator de reprodução da testemunha de valor 4,82.

Figura 27 - Efeito de isolados de *Bacillus* sob a parte aérea e as raízes de plantas de algodão cultivar FM975WS, aos 60 dias após semeadura, cultivadas em solo com infestação de *Fusarium* e inoculação de nematoides. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527



**Figura 28 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) – A; área foliar (cm<sup>2</sup>) – B; no índice SPAD – C; nos pesos (g) frescos e secos da parte aérea (DF) e do sistema radicular (E) e no número de ovos (G) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e com inoculação de nematoides, aos 60 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2- Rugby®, 3- Quartzzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



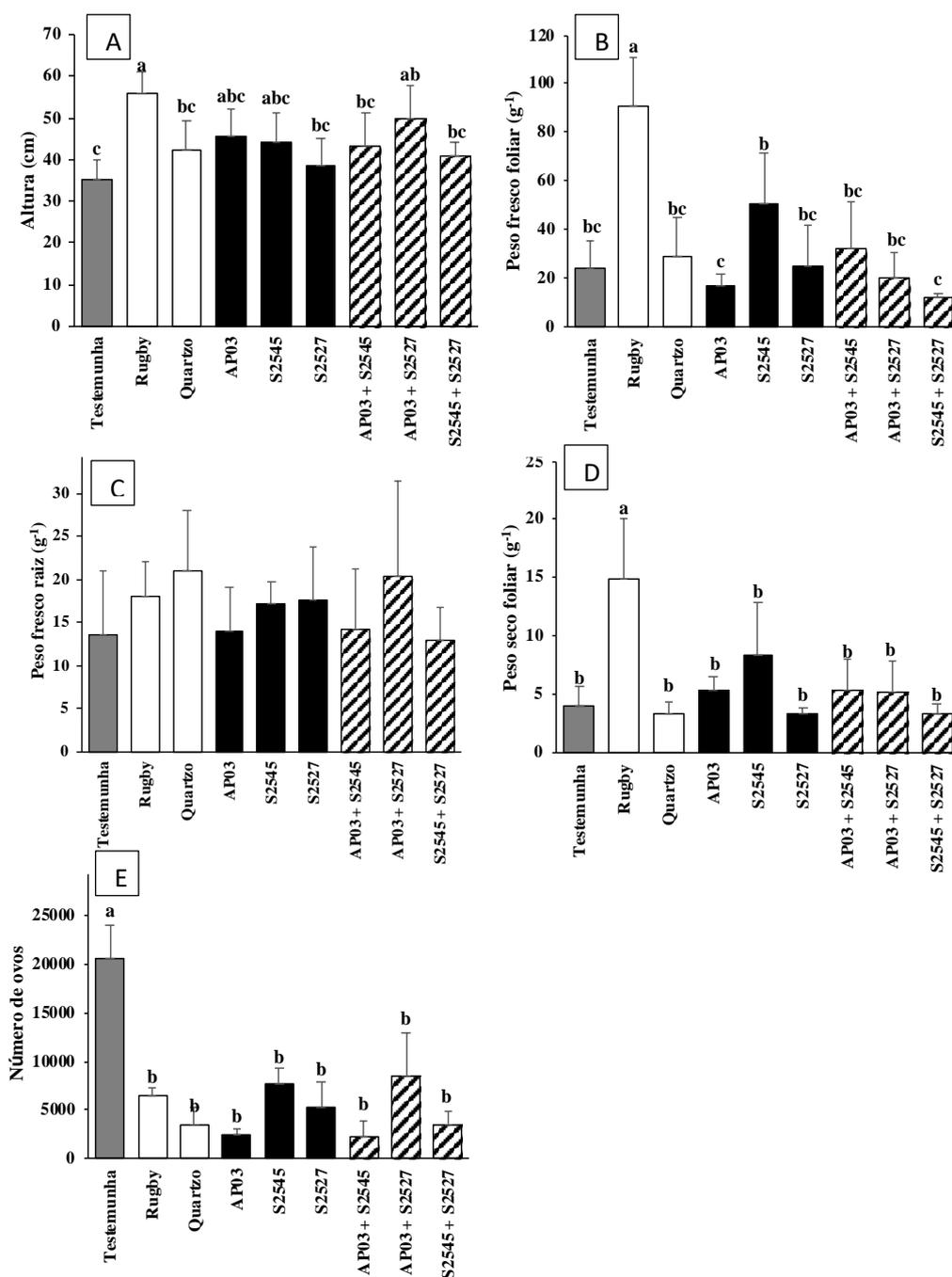
\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

Aos 120 dias da semeadura, em solos com infestação de *Fusarium* e inoculação de nematoides, as plantas tratadas com AP03+S2527 e o nematicida químico Rugby® diferiram da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) e proporcionaram aumento 43% e 57%, respectivamente, na altura de plantas quando comparados a testemunha (Figuras 29 e 30A). O tratamento químico Rugby® diferiu da testemunha ( $P \leq 0,05$ ) em relação aos pesos frescos e secos da parte aérea, com aumento de 270% e 240% em relação à testemunha, respectivamente (Figuras 29 e 30BD). As plantas tratadas com o isolado S2545 apresentaram aumento de 109% e 110% para os pesos frescos e secos da parte aérea, respectivamente (Figuras 29 e 30BD). Não houve diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamentos e a testemunha para o peso fresco de raiz (Figuras 29 e 30C). Todos os tratamentos reduziram o número de ovos (Figura 30 E) em relação à testemunha. As plantas tratadas com os isolados AP03+S2545, AP03 e S2545+S2527 proporcionaram uma redução de 89%, 88% e 83%, respectivamente, no número médio de ovos por planta, e reduziram o FR de 4 (testemunha) para 0,3, 0,4, 0,6, respectivamente. Além disso, todos os tratamentos de *Bacillus* foram estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ) semelhantes ao nematicida químico Rugby® (Figura 30E).

**Figura 29 - Efeito de isolados de *Bacillus* no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e com inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2 Rugby®, 3- Quartzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



**Figura 30 - Efeito de isolados de *Bacillus* na altura (cm) – A; nos pesos (g) frescos e secos da parte aérea (BD) e do sistema radicular (C) e no número de ovos (E) de plantas de algodão cultivar FM975WS, cultivadas em solo infestado com *Fusarium* e com inoculação de nematoides, aos 120 dias após semeadura. 1- Testemunha, 2 Rugby®, 3- Quartzzo®, 4- AP03, 5- S2545, 6- S2527, 7- AP03+S2545, 8- AP03+S2527, 9- S2545+S2527**



\*Médias seguidas pelas mesmas letras nos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$  probabilidade)

#### **4.14 Identificação das espécies de *Bacillus* por sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA**

As identificações das espécies foram baseadas no conjunto de oligonucleotídios da região do gene 16S rRNA. O índice de similaridade entre as sequências 16S rRNA dos três isolados de *Bacillus* com as linhagens tipo mais próximas foram de 100%. O tamanho do fragmento do isolado AP03 foi de 1516 pb, identificado como *Bacillus velezensis* (Tabela 11). Também os isolados S2527 e S2545 foram identificados como *Bacillus velezensis*, a partir dos fragmentos do gene 16S rRNA com tamanhos de 1517 e 1502 pb, respectivamente.

**Quadro 11 - Sequências do gene 16S rRNA dos três isolados de *Bacillus* e suas respectivas espécies**

Isolados	Sequência gene 16S rRNA	Espécie
AP03	<p>CTTACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCT            CCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGT            GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT            CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATT            GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA            GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGCA            GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG            GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT            GCCCCGGAAGGGGACGTCCTATCTTAGGATTGTCAGAGGATGTCAGAACCTGGTAAGG            TTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAT            TCCTTTGAGTTTCAGCTTGGCAGCCGACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTG            CAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA            CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACC            AGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTACGCATTTACCAGCTACAGCT            GGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTT            GAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATA            ATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGATTACCAGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCCT            GGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCT            AACACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTCAGAC            TTTCTGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTC            AGTCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGCTCCGCTTGGTGAAC            GTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCA            CCTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGG            AGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACAT            CAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCCGC</p>	<i>B. velezensis</i>
S2527	<p>CTTACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCT            CCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGT            GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT            CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATT            GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA            GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGCA            GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG            GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT            GCCCCGGAAGGGGACGTCCTATCTTAGGATTGTCAGAGGATGTCAGAACCTGGTAAGG            TTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAT            TCCTTTGAGTTTCAGCTTGGCAGCCGACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTG            CAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA            CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACC            AGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTACGCATTTACCAGCTACAGCT            GGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTG            AGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT            TCCGGACAACGCTTGCACCTACGTTTACCAGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGTGG            CTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAA            CAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTCAGACTT            TCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCA            GTCCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTCCGCTTGGTAGCCCG            TTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCAC            CTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGA            GTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACATC            AGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCCGCAGCGTT            CGTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA</p>	<i>B. velezensis</i>
S2545	<p>GTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACC            TCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG            GGAACGTATTACCAGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGT            CGAGTTGCAGACTGCGAATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCG            GTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCA            TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGCACTCACCTTAGAGTG            CCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC            ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGG            ACGTCTATCTTAGGATTGTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT            TCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA            GTCTTGGCAGGCTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGACGACTAAGGGG            CGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT            CCTGTTGCTGCCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAAGTTACAGACCAGAGTGCCTTCC            GCCACTGGTGTCTCCACATCTCTACGCATTTACCAGCTACAGTGGAAATTCACCTCTC            CTCTTCTGCACTCAAGTTCCCAAGTTTCCAATGACCCCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTT            CACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCT            TGCCACCTACGTTACCAGCGGCTGCTGGCAGCTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGT            ACGCTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGCTTTAC            GATCCGAAAACCTTCATCACTACGCGGCGGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGGA            AGATTCCTACTGCTGCCCTCCGTTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCC            GATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTCCGCTTGGTAGCCGTTACCTCACCAACTA            GCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGCTGAAC            ATGCGGTTTACAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCGGGAGTTATCCAGTCTTAC            AGGAGGTTACCCACGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCC            ATCTGCTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCCGCAGCGTTGCTCTGAGCCAGGA            TCAAACCTCT</p>	<i>B. velezensis</i>

## 5 DISCUSSÃO

O isolamento e a seleção de antagonistas são fundamentais para se obter isolados eficientes para o desenvolvimento de bioprodutos. Apesar dos reconhecidos problemas, os testes *in vitro* são de grande importância neste processo. Contudo, há necessidade de se estabelecer previamente as características que serão consideradas durante o processo. As bactérias com potencial para serem usadas no controle biológico devem ter características particulares como estabilidade genética, eficácia em baixas concentrações, capacidade de colonizar hospedeiros, capacidade de sobreviver em condições adversas, ser efetivo contra uma gama de fitopatógenos e apresentar mais de um mecanismo de ação. A promoção de crescimento de plantas também se destaca como um mecanismo importante para agentes de biocontrole. A eficiência do gênero *Bacillus* como promotor de crescimento é relatada na literatura (ADREES et al., 2019; BALDERAS-RUÍZ et al., 2020; BHATTACHARYA et al., 2019; SUKKASEM et al., 2018).

A mistura de isolados de *Bacillus* AP03+S2527 promoveu o crescimento de plantas de algodoeiro em rizotrons aos 54 dias após a semedura (Figuras 9 e 10). Esse fato pode estar relacionado com o fato do isolado S2527 produzir ácido indol-3-acético (AIA) e o isolado AP03 produzir sideróforos e assimilar nitrogênio (Tabela 1). Espécies de *Bacillus* promovem o crescimento de plantas devido a produção de hormônios vegetais como AIA, que interfere diretamente na expansão radicular, proporcionando maior acesso aos nutrientes. Além disso, o nitrogênio é constituinte significativo de ácidos nucleicos, proteínas e outros compostos orgânicos nas plantas. Dessa forma, algumas espécies de *Bacillus* modificam as formas indisponíveis de N em formas disponíveis, mediante ação da enzima nitrogenase, para serem absorvidas pelas raízes das plantas (DING et al., 2005). Os dados do estudo corroboram com os obtidos por Sozer Bahadir et al. (2018), que observaram que os isolados de *Bacillus* estudados também produziram o fitohormônio AIA e aumentaram o comprimento radicular e da parte aérea e melhoraram o crescimento e desenvolvimento das plantas. Diaz; Baron; Rigobelo (2019) observaram a promoção de crescimento de plantas de algodão por três isolados de *Bacillus subtilis*, os quais produziram AIA na ordem de 11 a 13 µg AIA/ml e com isso aumentaram o peso de parte aérea e de raízes, melhorando o rendimento das plantas. Além disso, *Bacillus* spp. podem produzir sideróforos, ou seja, o ferro que é essencial para o crescimento celular e o

metabolismo, de modo que a aquisição de  $Fe^{+}$ , através da produção de sideróforos, desempenha um papel essencial na determinação da aptidão competitiva das bactérias para colonizar raízes de plantas e competir por ferro com outros microrganismos na rizosfera (CROWLEY, 2006). Do mesmo modo, a produção de sideróforos podem prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos sequestrando  $Fe^{3+}$  na área ao redor da raiz (SIDDIQUI, 2006). Os isolados promotores de crescimento selecionados no presente estudo evidenciaram ser colonizadores de raízes (Figura 11), que é uma característica essencial para os microrganismos promotores de crescimento de plantas. Os experimentos de 15 e 80 dias para promoção de crescimento (Tabelas 5 a 7 e Figuras 7 e 8), não mostraram efeito significativo. Isso pode ser explicado pela composição do substrato utilizado nos vasos, uma vez que no experimento em rizotrons (Figuras 9 e 10) foi observado o efeito benéfico dos isolados. Neste ensaio, o substrato foi composto de areia e solo, e desse modo, os isolados tiveram um maior contato no desenvolvimento da raiz e, provavelmente foi capaz de colonizá-la. No ensaio *in vitro* (Figura 11), foi observado a capacidade de *Bacillus* em se aderir a raiz da planta e, dessa maneira, podendo disponibilizar nutrientes, água e proteger a planta contra patógenos de solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Pindi et al. (2014), os quais investigaram a eficiência de *Bacillus* sp. PU-7 em quatro tipos de solo na Índia na cultura do algodão e observaram incremento na altura, peso fresco e seco das plantas em solos negros profundos, seguidos de solos negros rasos, porém em solos vermelho e arenoso, a promoção de crescimento não foi evidenciada. Além disso, os autores também avaliaram sete espécies de *Bacillus* em 17 cultivares de algodão e concluíram que nem sempre a mesma cepa de *Bacillus* promove o crescimento de plantas em cultivares diferentes.

O teste de pareamento com *Fusarium* e a inibição da germinação de conídios mostraram que alguns isolados inibiram o crescimento do patógeno (Figura 1 e Tabela 3). Isso pode ser explicado por diferentes mecanismos de ação relatados com *Bacillus* no controle de *Fusarium* (KHAN; MAYMON; HIRSCH, 2017; PLANCHON et al., 2021; ZHU et al., 2020). Esses dados corroboram com Zhang; Howell; Starr (1996), em que cepas de *B. subtilis* exibiram forte inibição de *Fov in vitro*. Em outro estudo, Zhu et al. (2020) verificaram que *B. subtilis* IBFCBF-4 reduziram a incidência de murcha de *Fusarium* em 51,1% em comparação com o controle e que os compostos, voláteis e não voláteis, produzidos por *B. subtilis* foram capazes de suprimir o crescimento

micelial, além de mostrar que o isolado pode causar edema anormal e aumento da ramificação das hifas do patógeno. Entretanto, os resultados da Figura 20EG sugerem que as espécies de *Bacillus* utilizadas neste estudo exibiram potencial em suportar a presença do patógeno e aumentaram o sistema radicular das plantas tratadas. Dessa maneira, algumas espécies de *Bacillus* apresentam antagonismo a patógenos fúngicos competindo por nichos e nutrientes essenciais (WHIPPS, 2001) ou pela produção de compostos fungitóxicos (CAWOY et al., 2015), e também pela indução de resistência sistêmica adquirida (RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD ALLAH, 2017). Além disso, a produção de sideróforos é outro atributo importante, pois priva os fungos fitopatogênicos desse nutriente essencial. A produção de enzimas extracelulares por *Bacillus* spp. pode causar a distorção nas paredes celulares das hifas de *F. oxysporum* ou a lise da parede em resposta à quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase (DASGUPTA; KHAN; NAUTIYAL, 2006; SWIONTEK BRZEZINSKA et al., 2014). Estudos *in vitro* mostraram que a quitinase produzida por *B. subtilis* causou lise em *F. oxysporum* do inhame (SWAIN; RAY; NAUTIYAL, 2008). Além disso, Zhao et al. (2014) observaram que *B. subtilis* SG6 exibiu forte antagonismo contra *F. graminearum* em ensaios *in vitro* e inibiu a esporulação no patógeno, resultados que corroboram com os do presente estudo (Figura 1 e Tabela 3). Do mesmo modo, foi identificado que o ácido fenilacético, produzido por *Bacillus fortis*, como o principal fator responsável pela colonização eficiente na rizosfera da planta e na supressão de *Fusarium* (AKRAM; ANJUM; ALI, 2016).

Três famílias de lipopeptídeos (iturinas, fengicinas e surfactinas) produzidas por *Bacillus* vem sendo pesquisados quanto à atividade antagônica (KHAN; MAYMON; HIRSCH, 2017). Sandrin et al. (1990) reportaram forte atividade antifúngica das iturinas e fengicinas. No entanto, as surfactinas não exibiram efeito tóxico aos fungos. Por outro lado, foi demonstrado a atividade antifúngica da surfactina de *B. amyloliquefaciens* no controle de *F. oxysporum* (VITULLO et al., 2012). Alta produção de fengicina e iturina de *B. subtilis* 98S foi observada na presença de *Fusarium*, porém a produção desses lipopeptídeos não foi observada na presença de *Botrytis* (CAWOY et al., 2015). Assim, parece que a ativação de diferentes lipopeptídeos depende da presença do patógeno fúngico específico. Dessa forma, em estudo com análises de PCR foi verificado a presença dos genes *ituA*, *ituB*, *ituC*, *ituD*, *bamD*, *bmyB*, *fenB*, *srfAB*, *surf*, *bacA*, *bacD*, *bacAB*, *tasA*, *mrsA* e *mrsM* envolvidos na biossíntese de iturina A, bacilomicina, fengicina, surfactina, bacilisina, *tasA* e mersacidina,

respectivamente, sendo estes alguns dos responsáveis pelo mecanismo antagônico a *Fusarium* (ZHU et al., 2020).

Nos bioensaios de nematoides *in vitro*, os metabólitos secundários dos isolados de *Bacillus* apresentaram atividade nematicida contra os J2 de *M. incognita*, causando elevada mortalidade (Tabela 9). O uso de *Bacillus* tem sido relatado para o biocontrole de nematoides parasitas de plantas (PADGHAM; SIKORA, 2007; SHAFI; TIAN; JI, 2017; XIANG; LAWRENCE; DONALD, 2018). Resultados semelhantes foram encontrados por Engelbrecht et al. (2020), em que houve mortalidade de 86% por filtrado de *B. soli* sobre J2 de *M. incognita*. Além disso, Xiang et al. (2017) verificaram que *B. altitudinis*, *B. aryabhattai* e *B. safensis* exibiram 100% de mortalidade sobre J2 *in vitro*. No presente estudo, alguns isolados exibiram efeito ovicida, reduzindo a eclosão de J2 ao longo do tempo (Tabela 10). Esses dados corroboram com os obtidos por Alves et al. (2011), os quais verificaram redução de 75,6% na eclosão *M. javanica* por isolados bacterianos e, também os de Huang et al. (2010), os quais observaram ação nematicida de substâncias químicas produzidas por *B. megaterium* contra *M. incognita* inibindo 100% da eclosão de juvenis. Do mesmo modo, Padgham; Sikora (2007) observaram 60% na redução da eclosão de ovos a partir de concentrações de 25% do metabólito secundários de *B. megaterium*. Esses autores, também relataram que as concentrações de metabólitos secundários abaixo de 25% não causaram redução significativa na eclosão dos ovos. Aliado aos resultados *in vitro*, nos testes *in vivo* foi demonstrado que os isolados reduziram significativamente o número de ovos por planta (Figura 14) o que, possivelmente, indica alguma reação dos nematoides à presença da bactéria ou das substâncias produzidas por elas.

As espécies de *Bacillus* ao colonizarem raízes são capazes de atingir vários pontos de vulnerabilidade no ciclo de vida do nematoide, podendo inibir a penetração, reduzir a capacidade reprodutiva e retardar a mobilidade do nematoide e a eclosão dos ovos. Os resultados obtidos no presente estudo, corroboram com os de Xiang et al. (2017), os quais verificaram que *B. velezensis* e *B. mojavensis* foram relativamente consistentes na redução de ovos de *M. incognita* em algodão, suprimindo a densidade populacional do nematoide. Ainda, Berlitz et al. (2016) observaram redução de 90% no número de ovos de *M. javanica* em alface tratada com *B. subtilis*. Também Choi et al. (2020) observaram que *B. thuringiensis* KYC e *B. velezensis* CE 100 exibiram atividade antagônica a *M. incognita* reduzindo a densidade populacional do nematoide em plantas de tomate, e que o conteúdo interno do ovo e do corpo do J2 estavam

danificados, possivelmente por ação de enzimas extracelulares liberadas pelas espécies de *Bacillus*.

Os isolados aqui selecionados foram eficientes na redução do número de ovos por planta (Figuras 28G e 30E), mantendo a planta a viva mesmo na presença de ambos os patógenos, conforme observado nos ensaios conduzidos em casa-de-vegetação aos 60 e 120 dias após a semeadura. O modo de ação de algumas espécies de *Bacillus* foi estudado por Ramyabharathi et al. (2018), que revelaram que *B. subtilis* Bbv57 produziu peptídeos antimicrobianos cíclicos surfactina e iturina, os quais produziram ação antifúngica e antinematocida com redução de 15% na incidência da murcha e 71% na densidade populacional do nematoide, possuindo potencial para uso no biocontrole do complexo *Fusarium*-nematoide em gérbera. A aplicação de *B. megaterium* reduziu significativamente a incidência da doença de murcha por *Fusarium* e a infecção causada por *M. incognita* e *javanica* em batata (EL-SHENNawy et al., 2012). De acordo com os autores, isso por ter ocorrido devido a *Bacillus* spp. desempenhar um papel importante no controle de fungos do solo e nematoides por vários mecanismos como a produção de substâncias inibidoras, competição por nicho ecológico ou indução de resistência sistêmica em plantas hospedeiras. Além disso, Leifert et al. (1995) observaram que *Bacillus* spp. produzem antibióticos tóxicos para nematoides, como a fengicina e zwittermicina A e antibióticos antifúngicos, que inibem o crescimento de *F. oxysporum*. Na literatura há poucos relatos sobre o controle do complexo Fus-nem em algodão, e os trabalhos existentes não foram realizados da mesma maneira, nem na mesma região, tornando difícil a comparação e discussão com outros estudos de interações de patógenos, pois as condições são diferentes. Desse modo, os isolados podem ter liberados enzimas extracelulares como proteases, quitinases e colagnases que são importantes para degradação das paredes de fungos e nematoides, conforme observado por QiuHong et al. (2006). Huang et al. (2010) observaram que *B. megaterium* YMF inibiu a eclosão de ovos de nematoides e reduziu a infecção de *M. incognita* mediante a produção de voláteis nematicidas como benzenoacetaldeído, 2-nonanona, decanal, 2-undecanona e dissulfeto de dimetila, ativos contra juvenis e ovos. Esses relatos indicam que o modo de ação de *Bacillus* spp. com atividade nematicida está provavelmente relacionado à produção de metabólitos bioativos, corroborando com resultados apresentados nas Figuras 24G e 26E. Do mesmo modo, é possível que a redução da densidade populacional de *M. incognita* observada nesse estudo poderia ser resultado da indução de resistência

sistêmica do hospedeiro. Há relatos de cepas específicas de *Bacillus* como *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. mycooides* e *B. sphaericus* agindo como elicitores e causando reduções na severidade e incidência de nematoide de galhas (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004).

De modo geral, não existe um protocolo a ser seguido para screening de microrganismos com atividade antagonica, dessa maneira, optou-se pelos testes descritos *in vitro*, *in vivo*, e os de promoção de crescimento para seleção de microrganismos. Esses testes estão de acordo com alguns autores (ENGELBRECHT et al., 2020; ZHU et al., 2020; LIU et al., 2020; YANG et al., 2018), embora a maioria realize screening de antagonistas somente para um fitopatógeno. Não existem muitos trabalhos que utilizam tantos critérios para a seleção, no entanto foi desenvolvida uma abordagem para encontrar microrganismos mais robustos com um bom desempenho *in vivo* e controlando dois fitopatógenos simultaneamente.

Desse modo, esse processo de screening para seleção de microrganismos antagonicos é considerado efetivo, pois os resultados obtidos com os isolados selecionados foram promissores, encontrando-se resultados melhores que os agentes de controle biológico padrão testados. Além disso, as misturas de isolados selecionados apresentaram um efeito positivo, considerando-se que um pode ser complementar ao outro, com relação aos seus mecanismos de ação, ocorrendo um efeito sinérgico ou de adição entre os isolados e, dessa forma, ocasionando efeito benéficos para o hospedeiro, o que também ocorreu com outros trabalhos (YANTI et al., 2020; COLAGIERO; ROSSO; CIANCIO, 2018; SURYADI et al., 2013). No entanto, mais pesquisas são necessárias para abordar os modos de ação das espécies de *Bacillus* aqui estudadas, principalmente a realização de ensaios em condições de cultivo comercial de algodão.

## 6 CONCLUSÃO

Os isolados de *Bacillus* apresentaram atividade antagônica *in vitro* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e a *Meloidogyne incognita*.

Em ensaios *in vivo*, os isolados de *Bacillus* selecionados reduziram o número de ovos por planta, controlando *Meloidogyne incognita*.

Os isolados selecionados, *in vivo*, controlaram a murcha de *Fusarium* e *Meloidogyne incognita* quando estes patógenos ocorreram simultaneamente.

A mistura de isolados de *Bacillus* apresentou resultados promissores neste trabalho para o controle dos fitopatógenos.

Em rizotrons os isolados de *Bacillus* selecionados e suas misturas promoveram o crescimento de plantas de algodão.

Todos os isolados selecionados foram identificados como *Bacillus velezensis*.

Os isolados de *Bacillus* selecionados têm potencial para serem promissores agentes de biocontrole de fitopatógenos de solo, podendo ser alternativas aos produtos químicos.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, P. et al. Root-knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2003.
- ABRAPA, **Associação Brasileira dos Produtores de Algodão**, Brasília, 2021. Estatísticas: Mundo Disponível em:<  
<http://www.abrapa.com.br/biblioteca/Paginas/Biblioteca.aspx>>. Acesso 04/01/2021.
- ADREES, H. et al. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. **Crop Protection**, v. 115, n. February 2018, p. 75–83, 2019.
- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em:  
[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso 06/01/2021.
- AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Phenylacetic acid is ISR determinant produced by *Bacillus fortis* IAGS162, which involves extensive re-modulation in metabolomics of tomato to protect against Fusarium wilt. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. APR2016, p. 1–12, 2016.
- ALVES, G. C. S. et al. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaei*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 557–564, 2011.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres. v.1, ed.4, 704p. 2011.
- AMORIM, S. et al. **Zoneamento agroecológico e definição de época de semeadura do algodoeiro no Brasil** Agroecological Zoning and definition of sowing periods for cotton in Brazil. p. 422–428, 2001.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. A new race (race 6) of the cotton-wilt fusarium from Brazil. **Plant Disease Reporter**, v.62, n.5, p.421-423,1978.
- ASSIGBETSE, K. et al. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on Cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. **Phytopathology**, 1994.
- BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 307–319, 2004.
- BAKER, K.; RAMSDELL, D.; GILLET, J. Electron microscopy: current applications to plant virology. **Plant Disease** v.69, p.85-90, 1985.
- BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-

stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 451–457, 1987.

BALDERAS-RUIZ, K. A. et al. *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.

BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L. A.; POTTER, N.; BRUBAKER, C. L. Development of a rapid, accurate glasshouse bioassay for assessing *fusarium* wilt disease responses in cultivated *Gossypium* species. **Plant Pathology**, v. 61, n. 6, p. 1112–1120, 2012.

BERLITZ, D. L. et al. Evaluation of biocontrol of the *Meloidogyne javanica* with *Bacillus subtilis* and *Purpureocillium lilacinus* in greenhouse with lettuce. **International Journal of Research in Engineering**, v. 452, n. August, p. 38–45, 2016.

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *P. oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)** Piracicaba, 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 1988.

BETTIOL, W., BRANDÃO, M. S. B., SAITO, M. L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. v.18, p.153-159, 1992.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. v. 20, p.119-123, 1994.

BETTIOL, W.; VARZEA, V. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastarix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 91–95, 1992.

BHATTACHARYA, A. et al. Intervention of bio-protective endophyte *Bacillus tequilensis* enhance physiological strength of tomato during *Fusarium* wilt infection. **Biological Control**, v. 139, n. August, p. 104074, 2019.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.553, 1981.

BORÉM, A.; FREIRE, E. C. Algodão do plantio à colheita. Ed, UFV. Viçosa.  
BRIDGE, J. Nematodes. In: HILLOCKS, R.J. **Cotton Disease**. CAB International, UK. O. p.331-353, 2014.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.535-538, 1991.

BURKETT-CADENA, M. et al. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by

rhizobacteria. **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 55–59, 2008.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A. Q. **Doenças do algodoeiro diagnose e controle**. Várzea Grande: UNIVAG/UFMT, 2005. 47p.

CAWOY, H. et al. *Bacillus* based biological control. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 1849, n. 2004, p. 30, 2009.

CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281–295, 2015.

COX, K. L. et al. Return of old foes — recurrence of bacterial blight and Fusarium wilt of cotton. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 50, p. 95–103, 2019.

CHI, M. et al. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113–119, 2015.

CHOI, T. G. et al. Role of bacterial antagonists of fungal pathogens, *Bacillus thuringiensis* KYC and *Bacillus velezensis* CE 100 in control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and subsequent growth promotion of tomato. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 7, p. 685–700, 2020.

CIA, E. et al. Desenvolvimento de resistência múltipla a doenças em linhagens avançadas de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 420–423, 2003.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro annual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopatologica**, v.3, n.3, p.167-193, 1977.

CIA, E.; GALBIERI, R. Doenças do algodoeiro. In: Amorim, L; Resende, J. A. M., Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. (5 Ed). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres. v.2, p.41- 52, 2016.

COLAGIERO, M.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A. Diversity and biocontrol potential of bacterial consortia associated to root-knot nematodes. **Biological Control**, v. 120, p. 11–16, 2018.

CONRATH, U. et al. Priming for Enhanced Defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 97–119, 2015.

CROWLEY, D. E. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: Barton LL, Abadía J (eds) **Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms**. Springer, Netherlands, p. 169–198, 2006.

DA SILVA, M. B. et al. Fusarium wilt of cotton may commonly result from the interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* with *Belonolaimus*

*longicaudatus*. **Journal of Nematology**, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2019.

DASGUPTA, S. M.; KHAN, N.; NAUTIYAL, C. S. Biologic control ability of plant growth-promoting *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488 isolated from milk. **Current Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 502–505, 2006.

DAVIS, R. M. et al. Fusarium wilt of cotton: Population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, p. 692–703, 2006.

DE CAL, A. et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant Pathology**, v. 44, n. 5, p. 909–917, 1995.

DETZ, E. A.; STINTZI, A.; RAYMOND, K. N. Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1087–1097, 2006.

DIAZ, P. A. E.; BARON, N. C.; RIGOBELLO, E. C. *Bacillus* spp. as plant growth-promoting bacteria in cotton under greenhouse conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 12, p. 2003–2014, 2019.

DING, Y. et al. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1271–1281, 2005.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Itaguaí: **Embrapa-CNPAB**, 1995. 60 p.

DORIGHELLO, D. V. et al. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, v. 67, p. 59–65, 2015.

DORIGHELLO, D. V. **VERSATILIDADE DE Bacillus spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**. 2017. 135p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós Graduação em Agronomia / Proteção de Plantas. Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCA). Botucatu

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 269–275, 2008.

EL-SHENNawy, M. Z. et al. Biological control of the disease complex on potato caused by root-knot nematode and Fusarium wilt fungus. **Nematologia Mediterranea**, v. 40, n. 2, p. 169–172, 2012.

EMMERT, E. A. ; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 1, p. 1–9, 1999.

ENGELBRECHT, G. et al. In vitro bioassays to determine the effect of *Bacillus soli* filtrates on the paralysis of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Nematology**, v. 22, n. 2, p. 239–243, 2020.

- EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.590-592, 1997.
- FERRAZ, S. et. al. **Manejo Sustentável de Fitonematoides**. 1 ed. Viçosa, MG. Ed. UFV, 304p., 2010.
- FLEGG, J. J. M. Extraction of *Xithinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. **Annual Applied Biology**. v.60, p.429-437, 1967.
- FONTES, E. M. G.; RAMALHO, F. S.; UNDERWOOD, E. et al. The cotton agriculture context in Brazil. In: HILBECK A.; ANDOW D. A.; FONTES E. M. G. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p.133-154.
- FREIRE, E. F. **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília. 2007.
- GALBIERI, R. et al. Desempenho de genótipos de algodoeiro na presença ou não de rotação de cultura com *Crotalaria spectabilis*, em área infestada com *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 5, p. 303-307, 2011.
- GALBIERI, R.; ASMUS, G. L. Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (Eds.) **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, Brasil, pp. 11-36, 2016.
- GALBIERI, R. et al. Influência de parâmetros de solo na ocorrência de fitonematoides. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (Eds) **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, Brasil, p. 37-89, 2016.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195., 1951.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195–202, 1998.
- GRIMES, D. W.; CARTER, L. M. A linear rule for direct non destructive leaf area measurements. **Agronomy Journal**, v.61, p.477-479, 1969.
- HADDAD, F. et al. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, v. 49, n. 2, p. 114–119, 2009.
- HILLOCKS, R.J. Fusarium wilt. In: HILLOCKS, R.J. (Ed.). **Cotton diseases**. Wallington: CAB International, c. 4, p. 127-160. 1992.
- HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium*

- YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 3, p. 417–422, 2010.
- HYER, A.H. et al. Resistance to root knot nematode in control of root-knot nematode-fusarium wilt disease complex in cotton. **Crop Science**. v.19, p. 898-901, 1974.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019–1032, 2008.
- JHA, D. C.; SARAF, M. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 0108–0119, 2015.
- KAMAL, M. M. et al. Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 1–14, 2016.
- KAMEI, A.; DOLAI, A. K.; KAMEI, A. Role of Hydrogen Cyanide Secondary Metabolite of Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biopesticides of Weeds. **Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary**, v. 14, n. 6, p. 109–112, 2014.
- KANG, S. M. et al. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 427–433, 2014.
- KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood on sugarbeet. **Journal of Biological Control**, v. 21, n. 2, p. 211–215, 2007.
- KHAN, M. R.; KOUNSAR, K.; HAMID, A. Effect of certain rhizobacteria and antagonistic fungi on root-modulation and root-knot nematode disease of green gram. **Nematologia Mediterranea**, v. 30, n. 1, p. 85–89, 2002.
- KHAN, N.; MAYMON, M.; HIRSCH, A. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 75, 2017.
- KIM, Y.; HUTMACHER, R. B.; DAVIS, R. M. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 4, p. 366–372, 2005.
- KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, 2004.
- KLOEPPER, J. W. et al. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant Soil** v.139, p.75-84, 1992.

- KOENNING, S. R. et al. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: Old and emerging production challenges. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 100–113, 2004.
- KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. July, p. 1–19, 2019.
- KRECHEL, A. et al. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 772–786, 2002.
- KULIMUSHI, P. Z. et al. Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29808–29821, 2018.
- LAMOVŠEK, J.; UREK, G.; TRDAN, S. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the pests. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 101, n. 2, p. 263–275, 2013.
- LANNA-FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. DE. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In STACKEBRANDT E.; GOODFELLOW, M. (ed.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons, New York, p.115-175, 1991.
- LEÃO, E. U. et al. Potencial *in vitro* de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. **Summa Phytopathologica**. v.42, n.4, p.360-362, 2016.
- LEIFERT, C. et al. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 2, p. 97–108, 1995.
- LIU, G. et al. Screening, identification and application of soil bacteria with nematicidal activity against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato. **Pest Management Science**, v. 76, n. 6, p. 2217–2224, 2020.
- LIU, K. et al. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 928–936, 2017.
- LORDELO, L.G.E. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo, Nobel, 3<sup>o</sup> edição, 196 p., 1976.

- MACHADO, V. et al. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165–182, 2012.
- MACHADO, A. C. Z. et al. Controle Biológico. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (Eds.) **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, Brasil, pp. 11-36, 2016.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.
- MARINGONI, A.C. **Técnicas em Fitobacteriologia**. FEPAF, Botucatu - SP, 40 p., 2010.
- MARTINS, S. J. et al. Common bean growth and health promoted by rhizobacteria and the contribution of magnesium to the observed responses. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 49–55, 2015.
- MATHUR, S. B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. International Seed Testing Association, Copenhagen, Denmark, 2003. 425p.
- MATOS, A. D. M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2945–2954, 2017.
- MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**. v.26, p.195-219, 1923.
- MENDOZA, A. R.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. *In vitro* activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 377–389, 2008.
- MOHAMMED, S. H. et al. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 57–66, 2008.
- MONNERAT, R. G. et al. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291–295, 2007.
- National Cotton Council of America: **Pest Management** (Internet). 2018.
- NASH, S. M.; SNYDER, W. C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**. v.52, p.567-572, 1962.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão**

(*Capsicum annuum* L.). 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen**. v.66, p.1-46, 1966.

PADGHAM, J. L.; SIKORA, R. A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 971–977, 2007.

PAZ, I. C. P. et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 106–109, 2018.

PENG, D. et al. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin. **Pest Management Science**, v. 70, n. 2, p. 258–263, 2014.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, 2014.

PINDI, P. K.; SULTANA, T.; VOOTLA, P. K. Plant growth regulation of Bt-cotton through *Bacillus* species. **3 Biotech**, v. 4, n. 3, p. 305–315, 2014.

PLANCHON, A. et al. Effect of a *Bacillus subtilis* strain on flax protection against *Fusarium oxysporum* and its impact on the root and stem cell walls. **Plant Cell and Environment**, v. 44, n. 1, p. 304–322, 2021.

QIUHONG, N. et al. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 722–730, 2006.

QUECINE, M. C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp)**. 2010. 197p. Tese (Doutorado), Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 126–135, 1995.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. May, p. 403–424, 2012.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. Sep, p. 1–14, 2017.

- RAMYABHARATHI, S. A. et al. Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by *Bacillus subtilis* under protected cultivation. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2018.
- RAO, M. S. et al. *Bacillus subtilis* IHR BS-2 enriched vermicompost controls root knot nematode and soft rot disease complex in carrot. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 56–62, 2017.
- RAUT, L. S.; DALVI, S. M.; MANWAR, A. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii*. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 26–34, 2011.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 278, 2001.
- SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, n.4, p.370-375, 1990.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p.47-56, 1987.
- SERFOJI, P.; RAJESHKUMAR, S.; SELVARAJ, T. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato cv Pusa Ruby by using vermicompost, AM fungus, *Glomus aggregatum* and mycorrhiza helper bacterium, *Bacillus coagulans*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, n. 1, p. 37–45, 2010.
- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017.
- SIDDIQUI, Z. A. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: SIDDIQUI, Z. A.(ed). **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer, The Netherlands, p. 111–142, 2006.
- SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of root-rot disease complex of chickpea caused by *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina*. **Nematology Mediterranea**, v.20, p.199-202, 1992.
- SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.53, p.867-878, 1988.
- SMITH, S. N.; SNYDER, W. C. Persistence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in fields in the absence of cotton. **Phytopathology**, v.65, p.190-196, 1975.
- SMITH, S. N. et al. *Fusarium* wild of cotton. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. F. (Ed). **Fusarium: disease, biology and taxonomy**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University/University Park and London. p. 29-38, 1981.

SÖZER BAHADIR, P.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183–196, 2018.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science and Technology**, v. 47, p. 39–49, 2016.

STARR, J. L.; COOK, R., BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematode**. CABI, London-UK. p. 258, 2002.

STARR, J. L. et al. The future of nematode management in cotton. **Journal of Nematology**, v. 39, n. 4, p. 283–294, 2007.

STARR, J. L.; Cotton. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAN, G. L (Ed.). **Plant and nematode interaction**. American Society of Agronomy, Madison, p. 359–379, 1998.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005.

SUASSUNA, N. D., COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no Cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. F. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília, 2015.

SUKKASEM, P. et al. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, n. August, p. 541–551, 2018.

SURYADI, Y. et al. Efficacy of consortium bacteria for control rice diseases under System of Rice Intensification (SRI) in West Java-Indonesia. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, v. 12, n. 1, p. 143–147, 2013.

SWAIN, M. R.; RAY, R. C.; NAUTIYAL, C. S. Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung against postharvest yam (*Dioscorea rotundata* L.) pathogens. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 407–411, 2008.

SWIONTEK BRZEZINSKA, M. et al. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 71–81, 2014.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: International Meloidogyne Project, North Carolina State University, 111p, 1978.

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**, v. 100, n.

2, p. 94–99, 2009.

THOMASHOW, L. S. et al. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 908–912, 1990.

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**, v. 61, n. 2, p. 197–213, 2007.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E. G. H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7292–7300, 2005.

TIWARI, S. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. August, 2017.

TORRES, C.; SANCLEMENTE, O. Los Microorganismos solubilizadores de Fosforo (MSF): Una Alternativa Biotecnológica Para Una Agricultura Sostenible. **Entramado**, v. 10, n. 2, p. 288–297, 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Cotton: world markets and trade. **ATA Journal**, v. 8, n. 5, p. 18–24, 2021.

VARDHARAJULA, S. et al. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: Effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2011.

VEIGAS, A. P. A murcha do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, v.10, p. 49-51, 1935.

VITULLO, D. et al. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 689–699, 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, **London**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

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

WU, K. et al. Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 132–138, 2017.

XIANG, N. et al. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 774–784,

2017.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7–8, p. 449–458, 2018.

XU, Z. et al. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2941–2950, 2014.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; FALCONÍ, C. E. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. **Biological Control**, v. 122, p. 67–75, 2018.

YANG, L. et al. Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* on wheat. **Biological Control**, v. 118, p. 1–9, 2018.

YANTI, Y. et al. The ability of indigenous bacillus spp. Consortia to control the anthracnose disease (*Colletotricum capsici*) and increase the growth of chili plants. **Biodiversitas**, v. 21, n. 1, p. 179–186, 2020.

YAO, A. et al. Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 39, n. 4, p. 323–328, 2006.

YOON, S. H. et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

YRUELA, I. Plant development regulation: Overview and perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 182, p. 62–78, 2015.

YUEN, G. Y. et al. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, v. 20, n. 5, p. 395–402, 2001.

ZHANG, J.; HOWELL, C. R.; STARR, J. L. Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and Fusarium wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 175–188, 1996.

ZHAO, Y. et al. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.

ZHU, J. et al. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against Fusarium wilt of watermelon. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 433–441, 2020.

ZUCKERMAN, B. M.; BRZESKI, M. W. Methods for the study of plant-parasitic nematodes in gnotobiotic root culture. **Nematologica**. 11, 453–466. 1966.