

DEUCLEITON JARDIM AMORIM

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDE-
DAS-GALHAS (*Meloidogyne incognita*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

Botucatu

2022

DEUCLEITON JARDIM AMORIM

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDE-
DAS-GALHAS (*Meloidogyne incognita*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Renata Siciliano Wilcken

Coorientadores: Dr. Luís Garrigós Leite

Dr^a. Adriana Aparecida Gabia

Botucatu

2022

A524p

Amorim, Deucleiton Jardim

Prospecção de bactérias no controle biológico de nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) e promoção de crescimento vegetal / Deucleiton Jardim Amorim. -- Botucatu, 2022

61 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Silvia Renata Siciliano Wilcken

1. Bacillus. 2. Controle biológico. 3. *Meloidogyne*. 4. *Pseudomonas*. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDE-DAS-GALHAS (*MELOIDOGYNE INCOGNITA*) E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

AUTOR: DEUCLEITON JARDIM AMORIM

ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

COORIENTADORA: ADRIANA APARECIDA GABIA

COORIENTADOR: LUÍS GARRIGÓS LEITE

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

Prof.^a Dr.^a SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN (Participação Virtual)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP



Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO (Participação Virtual)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP



Dr. FERNANDO BERTON BALDO (Participação Virtual)
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico



Botucatu, 24 de fevereiro de 2022

*À minha família, por ser como è:
minha mãe Maria L. J. Amorim;
meu pai João dos S. Amorim;
e meus irmãos.*

dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar. Graças a Ele tive condições de conduzir este estudo.

Aos meus queridos pais (Maria Lima Jardim Amorim e João dos Santos Amorim) e irmãos (Deoclecio, Deuciane, Marilane, Marisa, Antônio José e Maria Regina), pelo apoio incondicional.

À Profa. Dra. Silvia Renata S. Wilcken, pela orientação, ensinamentos e paciência.

À Dra. Adriana A. Gabia, pela coorientação, ensinamentos e paciência.

Ao Dr. Luís G. Leite, pela coorientação, ensinamentos e discussões valiosas.

Ao Dr. Fernando B. Baldo, pela dedicação e ensinamentos repassados durante a condução deste projeto.

Ao meu amigo e parceiro nesta pesquisa, Thiago Fornazari Tsujimoto. Agradeço por toda paciência, risadas, discussões, esforço e muitas outras qualidades que foram importantes durante a pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia Agrícola – FCA.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico do Centro Avançado em Proteção de Plantas e Saúde Animal – CAPSA (Instituto Biológico/Campinas).

Àqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente com esta pesquisa.

Aos professores e técnicos do Departamento de Proteção de Plantas/FCA.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.495587/2020-00.

RESUMO

Os nematoides-das-galhas, gênero *Meloidogyne*, causam prejuízos à agricultura, com perdas estimadas em mais de 100 bilhões de dólares em todo mundo. O manejo desses nematoides é um complicador para muitas culturas agrícolas. Assim, ao longo do tempo, muitos mecanismos foram adotados, a fim de minimizar os danos desses fitopatógenos, entre eles o controle biológico, além de outros. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias, para possível controle biológico de *Meloidogyne incognita* e promoção de crescimento vegetal. Plantas de tomateiro Santa Cruz 'Kada Gigante' foram inoculadas com esse nematoide a partir de uma população pura. Após 60 dias, raízes dessas plantas foram processadas para obtenção de juvenis de segundo estágio (J_{2s}). Cento e um isolados bacterianos foram inoculados em meio NB (Nutrient Broth), incubados a 180 rpm por 72 h, até chegarem, aproximadamente, 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC). Os testes *in vitro* foram realizados em três etapas, a primeira para seleção de isolados com mortalidade igual ou a 50%. Na segunda etapa foi utilizado nove isolados com de 10% de concentração da suspensão bacteriana, com avaliações às 24, 48 e 72 h, após a inoculação), inoculando $100 J_2 \text{ mL}^{-1}$. Cinco isolados foram selecionados para uma terceira etapa, com sete concentrações (0; 2; 4; 7; 10; 15; 20%), adicionando-as em tubos de ensaio e depois, uma suspensão de $500 J_2 \text{ mL}^{-1}$, após homogeneização, foram inoculados em placas de Petri de 6 mm de diâmetro sobre 12 g de areia sílica esterilizada, com avaliação realizada às 92 h, após a inoculação. Todas as triagens seguiram um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições em duplicata, tendo como testemunhas, água destilada e meio NB. As etapas *in vivo* foram divididas em duas, a primeira para avaliação do controle do nematoide, após 60 dias da inoculação de $1.000 J_2 \text{ mL}^{-1}$. Os tratamentos foram compostos de 5 e 15% da concentração da suspensão bacteriana dos seguintes isolados: 195b, MA07, 287a, 321b e 311a, tendo como testemunha água e meio NB. O segundo experimento foi composto pelos mesmos tratamentos, nas mesmas concentrações, para avaliação de promoção de crescimento vegetal, sem nematoides. As avaliações ocorreram após 60 dias da inoculação, sendo as variáveis: nematoides por grama de raiz, altura da parte aérea, massa fresca e massa seca da parte aérea, crescimento, massa fresca e massa seca da raiz, aferidas. Os experimentos foram repetidos duas vezes, com quatro repetições cada tratamento. O "screening" de toda a diversidade de bactérias finalizou com 14%

do total com mortalidade igual ou a 50% (20 isolados). Na segunda etapa cinco isolados foram eficientes, em uma concentração de 10% da suspensão bacteriana. Esses resultaram com mortalidade acima de 80%, já na terceira etapa, os cinco isolados nas diferentes concentrações atingiram mortalidade próxima de 100%. O isolado 287a foi o mais promissor no experimento de controle do nematoide, este demonstrou ser um agente bacteriano potencial, para o controle de juvenis, tendo uma baixa concentração de ovos + J₂, quando comparado com as testemunhas não tratadas com bactérias. Os isolados testados promoveram crescimento vegetal, pois as plantas inoculadas com bactérias cresceram mais que àquelas não tratadas. Esses resultados são promissores, pois indicam que foi possível selecionar isolados potenciais para o controle biológico de *Meloidogyne incognita* sob triagens *in vitro* e *in vivo*. Outros estudos em condições de campo necessitam ser realizados.

Palavras-Chave: *Bacillus*; controle biológico; *Meloidogyne*; *Pseudomonas*.

ABSTRACT

Root-knot nematodes, *Meloidogyne*, cause damage to agriculture, with losses estimated at more than 100 billion dollars worldwide. The management of this nematode is a complicating factor for many agricultural crops. Thus, over time, many mechanisms were adopted in order to minimize the damage of these phytopathogens, including biological control, among others. The objective of this research is to select bacteria for possible biological control of *Meloidogyne incognita* and plant growth promoting. Tomato plants Santa Cruz 'Kada Gigante' were inoculated with this nematode from a pure population and after 60 days, roots of these plants were processed to obtain second-stage juveniles (J_{2s}). Hundred one bacterial isolates were inoculated in NB medium (Nutrient Broth), incubated at 180 rpm for 72 h, with approximately 10⁸ colony-forming units (CFU). *In vitro* tests were performed in three stages, the first for selecting isolates with mortality equal to or 50%. In the second stage, nine isolates with 10% concentration of bacterial suspension were used, with evaluations at 24, 48 and 72 h after inoculation), inoculating 100 J₂ mL⁻¹. Five isolates were selected for a third stage, with seven concentrations (0; 2; 4; 7; 10; 15; 20%, evaluated at 92 h after inoculation), inoculating 500 J₂ mL⁻¹ in Petri dishes 6 mm in diameter on 12 g of sterile silica sand. All "screenings" followed a completely randomized experimental design, with four replicates in duplicate, with distilled water and NB medium as controls. The *in vivo* steps were divided into two, the first for evaluating the control of the nematode, 60 days after inoculation of 1,000 J₂ mL⁻¹. The treatments were composed of 5 and 15% of the bacterial suspension concentration of the following isolates: 195b, MA07, 287a, 321b and 311a, with water and NB medium as a control. The second experiment consisted of the same treatments, at the same concentrations, to evaluate plant growth promotion without nematodes. The evaluations took place 60 days after inoculation, and the variables were: nematodes per gram of root, height of shoot, fresh mass and dry mass of shoot, growth, fresh mass and dry mass of the root, measured. The experiments were repeated twice, with four repetitions each treatment. The "screening" of all bacterial diversity ended with 14% of the total with mortality equal to or 50% (20 isolates). In the second step, five isolates were efficient, at a concentration of 10% of the bacterial suspension. These resulted with mortality above 80%, in the third stage, the five isolates at different concentrations reached mortality close to 100%. Isolate 287a was the most promising

in the nematode control experiment, it proved to be a potential bacterial agent for the control of juveniles, having a low concentration of eggs + J₂ when compared to controls not treated with bacteria. The tested isolates promoted plant growth, as plants inoculated with bacteria grew more than untreated controls. These results are promising, as they indicate that it was possible to select potential isolates for the biological control of *Meloidogyne incognita* under *in vitro* and *in vivo* “screenings”. Biochemical tests, metabolite stability, molecular identification and experiments under field conditions with other agricultural crops need to be carried out.

Keywords: *Bacillus*; biological control; *Meloidogyne*; *Pseudomonas*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Gênero <i>Meloidogyne</i> Göldi, 1887	17
2.2	Bactérias no controle biológico de nematoides	18
2.3	Gênero <i>Bacillus</i> Cohn, 1872	19
2.4	Gênero <i>Pseudomonas</i> Migula, 1894	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Localização dos experimentos	25
3.2	Preparo de substrato e inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i>	25
3.3	Obtenção dos juvenis	25
3.4	Obtenção dos isolados bacterianos	26
3.5	Etapa I – “Screening” <i>in vitro</i>	26
3.6	Etapa II – Mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i> x tempo	27
3.7	Etapa III – Concentrações letais	27
3.8	Etapa IV – experimentos <i>in vivo</i>	28
3.8.1	Controle <i>in vivo</i> de <i>Meloidogyne incognita</i>	28
3.8.2	Promoção de crescimento vegetal	28
3.9	Avaliações nematológicas e vegetativas	29
3.10	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Etapa I – “Screening” <i>in vitro</i>	32
4.2	Etapa II – Mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i> x tempo	33
4.3	Etapa III – Concentrações x mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i>	35
4.4	Etapa IV – Experimentos <i>in vivo</i>	37
4.4.1	Controle <i>in vivo</i> de <i>Meloidogyne incognita</i>	37
4.4.2	Promoção de crescimento	41
5	DISCUSSÃO	44
5.1	Etapa I – “Screening” <i>in vitro</i>	44
5.2	Etapa II – Mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i> x tempo	45
5.3	Etapa III – Concentrações x mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i>	46

5.4 Etapa IV – Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> x promoção de crescimento.....	47
6 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A – EXEMPLO DO “SCREENING” <i>IN VITRO</i> EM AREIA SÍLICA	61
APÊNDICE B – EXEMPLO DOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	61

1 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides causam perdas na agricultura mundial, principalmente o nematoide-das-galhas, *Meloidogyne* Göldi, 1887 (Rhabditida: Meloidogynidae). As espécies de *Meloidogyne*, induzem a formação de galhas, nas raízes de hortaliças, fruteiras, soja, café, algodão, feijão e outras (CARNEIRO et al., 2016). As perdas anuais causadas por nematoides na agricultura são mais de 78–125 bilhões de dólares (SASSER; FRECKMAN, 1987; McCARTER, 2009). E para contornar este problema, programas sustentáveis de manejo integrado de nematoides tem sido implementado, utilizando agentes de biocontrole (MAZZUCHELLI; MAZZUCHELLI; DE ARAUJO et al., 2020). Esses agentes estão divididos entre fungos e bactérias, com destaque para o gênero *Bacillus*, que contempla 99% de todos os bionematicidas bacterianos já registrados no Brasil (AGROFIT, 2022).

No gênero *Meloidogyne* existem mais de 90 espécies descritas no mundo (SUBBOTIN; WAEYENBERGE; MOENS, 2013), das quais, *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid; White) Chitwood, *M. javanica* (Treb) Chitwood e *M. hapla* Chitwood, representam até 95% dos nematoides-das-galhas em solos cultivados, dependendo da cultura (CARNEIRO et al., 2016). A espécie *M. incognita* é retratada como a mais importante economicamente, podendo ser encontrada em regiões de clima quente e temperado (KARSSSEN; MOENS, 2013).

O manejo desses nematoides é muito complexo, portanto, o mais importante antes de tudo é a prevenção da entrada destes nas áreas cultiváveis. Contudo, é possível implementar medidas de manejo, principalmente o controle químico e biológico. Esses podem ser aplicados por meio do tratamento de sementes, via sulco ou rega (MACHADO, 2016; MACHADO et al., 2016).

O controle biológico de nematoides por meio de bionematicidas cresceu em torno de 35% no Brasil na safra 2019/20 (CULTIVAR, 2020). É utilizado em grandes culturas como a soja, algodão, cana-de-açúcar, milho e na hortifruticultura. Porém, ainda existe uma demanda por novos microrganismos.

Os primeiros passos para obtenção de microrganismos eficientes no biocontrole de fitopatógenos é o isolamento no local da doença e, após várias triagens *in vitro* e *in vivo*, previamente estabelecidas, utilizando métodos validados, é possível

selecionar as cepas mais eficientes para o desenvolvimento de bioprodutos (COTES et al., 2019; KÖHL et al., 2011; KÖHL et al., 2019).

As bactérias do gênero *Bacillus*, *Pasteuria* e *Pseudomonas* são aquelas que mais se destacam no controle biológico de nematoides (PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL et al., 2021; BISHOP et al., 2007; WANG et al., 2021). Essas atuam como antagonistas e/ou promotores de crescimento vegetal (ENGELBRECHT et al., 2018; FORGHANI; HAJIHASSANI, 2021; STIRLING, 2014).

Cepas específicas de *Bacillus* podem atuar no controle biológico de nematoides. A título de exemplo já foi constatado que *B. subtilis*, *B. amylolichofaciens*, *B. methylophilus* e *B. pumilus* são antagonistas à *Rotylenchulus reniformis*, *M. incognita*, *M. javanica*, *Ditylenchus destructor*, *Aphelenchoides besseyi*, *M. hapla* e *M. arenaria* (CASTILLO et al., 2013; GENG et al., 2016; XIA et al., 2011; MA et al., 2013; MOGHADDAM et al., 2014; LEE; KIM, 2016).

Diante disso, o objetivo deste estudo é selecionar isolados de bactérias para o controle biológico de *Meloidogyne incognita* e na promoção do crescimento vegetal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887

O gênero *Meloidogyne* (Göldi, 1892) pertence ao reino Animalia, filo Nematoda, classe Chromadorea, subclasse Cromadoria, ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, infra-ordem Tylenchomorpha, superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (BEZERRA et al., 2021; DE LEY; BLAXTER, 2004). Espécies deste gênero de nematoide causam perdas econômicas na agricultura e aquelas de maior importância para agricultura são *Meloidogyne incognita* (Kofoid; White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood, *M. enterolobii* Yang e Eisenback (= *M. mayaguensis* Rammah e Hirschman) (PINHEIRO, 2017; CARNEIRO et al., 2016).

No decorrer dos anos mais de 100 espécies do gênero *Meloidogyne* foram descritas (HUNT; HADDOO, 2009). Esse gênero de nematoide é caracterizado como endoparasita sedentário (HUSSEY; JANSSEN, 2002) com relações de parasitismo complexas com hospedeiros.

Nematoides do gênero *Meloidogyne*, na fase infecciosa (J₂), parasitam a raiz da planta, principalmente pela parte apical e se movem até o cilindro vascular, onde induzem a formação de células gigantes ou nutridoras (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2018; MARHAVÝ et al., 2019). O citoplasma dessas células é denso com núcleos múltiplos, pequenos vacúolos, proliferação de plastídios, mitocôndrias, estruturas de retículo endoplasmático e paredes celulares modificadas (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2015). Esses nematoides modificam a alocação de produtos fotossintéticos reduzindo o crescimento e a produção de plantas (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2018).

A principal resposta provocada pelo parasitismo por *Meloidogyne* são as galhas nas raízes das plantas. As células quando parasitadas pelo juvenil de segundo estágio (J₂) tornam-se multinucleadas ao serem submetidas a repetidas mitoses sem citocinese. Assim, grandes modificações ocorrem nas células entre elas o grande vacúolo central é substituído por pequenos vacúolos, o citoplasma aumenta em volume e densidade, e a parede da célula é remodelada para formar crescimentos internos elaborados. Os crescimentos da parede são locais de influxo de assimilados na célula gigante, para atender as necessidades nutricionais do nematoide (HUSSEY; GRUNDLER, 1998).

O juvenil se desenvolve em uma fêmea adulta globosa, que pode colocar em média 400 a 500 ovos, reunidos em uma massa gelatinosa, podendo ser observada na maioria das vezes, sobre a galha, mas em alguns casos fica no parênquima cortical. No ovo ocorre o desenvolvimento embrionário do juvenil de primeiro estágio (J₁), passando para o segundo estágio ainda dentro do ovo. O juvenil de segundo estágio (J₂) eclode do ovo por ação mecânica (movimento do estilete) e enzimática (quitinases produzidas nas glândulas esofagianas liberadas pelo seu estilete (SIDDIQUE; GRUNDLER, 2015).

O J₂ migra para o solo ou pode parasitar raízes próximas, esse direcionamento para as raízes é condicionado pelos exsudatos radiculares das plantas (BELL et al., 2019). Quando encontram um hospedeiro suscetível injetam substâncias nas células das raízes, levando a hipertrofia e a hiperplasia das células próximas de seu corpo, tendo como resultado a formação das células nutridoras (MOENS et al., 2009). O processo continua com a formação dos estádios J₃ e J₄ e, por fim adulto (fêmea ou macho). O ciclo de vida destes nematoides pode ser influenciado pela temperatura, umidade e planta hospedeira (TAYLOR; SASSER, 1983). As plantas quando parasitadas por nematoides podem ou não expressar sintomas, os mais comuns é o menor crescimento das plantas, clorose e redução do volume de enraizamento.

2.2 Bactérias no controle biológico de nematoides

O controle biológico de nematoides pode ser definido como a ação de um ou mais organismos, para redução de populações de nematoides ou na capacidade destes em causar danos às plantas, sendo possível acontecer naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, do hospedeiro ou da teia alimentar do solo, pela introdução de antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

Bactérias que já foram identificadas por métodos moleculares e que passaram por triagens para o controle biológico de nematoides não são patogênicas à animais domésticos, humanos e plantas. Essas compõem diferentes grupos taxonômicos, como *Bacillus* (Cohn), *Pseudomonas* (Migula), *Serratia* (Bizio), *Streptomyces* (Waksman; Henrici), *Burkholderia* (Yabuuchi) e *Paenibacillus* (J bovis). No entanto, o Brasil comercializa apenas bactérias do gênero *Bacillus* e *Pasteuria* (AGROFIT, 2022).

As pesquisas estão registrando ação de bactérias para diferentes gêneros de nematoides, mas as mais frequentes são aquelas com foco em espécies do gênero *Meloidogyne*, especialmente pela sua importância econômica. A bactéria *Bacillus firmus* pode atuar no controle biológico de *Rotylenchulus reniformis* e *M. incognita* (CASTILLO et al., 2013; GENG et al., 2016); *B. subtilis* (*M. javanica* e *Ditylenchus destructor*), *B. amylolichefaciens* (*M. javanica* e *Aphelenchoides besseyi*) (XIA et al. 2011), *B. methylophilicus* (*M. hapla*) (MA et al., 2013), *B. pumilus* (*M. javanica* e *M. arenaria*) (MOGHADDAM et al. (2014; LEE e KIM, 2016).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* mais relatadas com ação contra nematoides são as espécies *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. putida*, tendo como alvos *M. incognita*, *M. javanica*, *M. graminicola* (SIDDIQUI et al., 2005; SIDDIQUI et al., 2006; LUDWIG et al., 2013), *M. incognita* e *M. javanica* (ELBANNA et al., 2011; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2004), *M. incognita* e *Radopholus similis* (ELBANNA et al., 2011), respectivamente.

O gênero *Paenibacillus* abriga duas as espécies *P. polymyxa* e *P. lentimorbus* que já foram estudadas no controle biológico de *M. incognita* (SON et al., 2009). *Burkholderia* sp., *Serratia mascerans* e *Streptomyces avermitilis* também demonstraram ação contra o mesmo nematoide (MOHAMED et al., 2009; JAYAKUMAR, 2009).

Além dessas, algumas outras bactérias são importantes no controle biológico de nematoide, especialmente as do gênero *Pasteuria*, clado *Bacillus-Clostridium* (CHARLES et al., 2005). A espécie *P. penetrans* já foi relatada parasitando espécies de *Meloidogyne* (SAYRE; STARR, 1985), e a espécie *P. hartismeri* confirmada como parasita de *M. ardenensis* (BISHOP et al., 2007).

2.3 Gênero *Bacillus* Cohn, 1872

As bactérias do gênero *Bacillus* são utilizadas amplamente no controle biológico de nematoides. Estas bactérias são Gram positivas, pertencem ao reino Bacteria, sub-reino Posibacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Bacillaceae e gênero *Bacillus* (CAVALIER-SMITH, 2002; GIBBONS e MURRAY, 1978; PRÉVOT, 1953; FISCHER, 1895). Podem ser isoladas de água doce, água salgada, solo, plantas, animais e do ar, ou seja, estão presentes em todos os lugares na natureza (PIGNATELLI; MOYA, 2009).

Além disso, as espécies de *Bacillus* formam uma estrutura de resistência chamada de endósporo, podendo sobreviver em ambientes quentes ou frios, ácidos ou alcalinos, ricos ou pobres em nutrientes, úmidos ou secos e até mesmo na presença de metais pesados ou alta concentração de sais (LOGAN; VOS, 2015).

Assim fica evidente que os *Bacillus* são alternativas excelentes na composição de produtos biológicos para o manejo de organismos patogênicos de plantas e que habitam o solo, como, por exemplo, os nematoides. Os nematoides são os principais patógenos causadores de doenças em várias culturas de importância econômica em todo o mundo.

Estudos comprovaram que *B. subtilis* atua no controle de *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus zae* em cana-de-açúcar (MORGADO et al., 2015) e que *B. methylotrophicus* causa supressão na população de *M. incognita* e também aumento na produtividade de tomateiro (ZHOU et al., 2016). Dessa forma, é possível observar que além do manejo de nematoides existe um benefício lógico na produtividade das culturas.

A supressão de populações de nematoides ocorre pela produção de moléculas bioativas e metabólitos secundários produzidos pelas espécies de *Bacillus* e atrelado a isso a produção de endósporos facilita a formulação de produtos com uma longa vida de prateleira e também a possibilidade de longa sobrevivência no solo, tudo isso colabora para que muitos nematicidas biológicos no mundo sejam a base de *Bacillus* spp. (ENGELBRECHT et al., 2018).

Além disso, dependendo da cepa de *Bacillus* pode ocorrer produção de antibióticos (SANSINENA; ORTIZ, 2011), enzimas e metabólitos com atividade nematicida (ABBASI et al., 2014), colonização das raízes das plantas (JAMAL et al., 2017), promoção de crescimento vegetal (ABBASI et al., 2014; LEE; KIM, 2016) e pode ser encontrado na rizosfera da maioria das plantas (SANSINENA; ORTIZ, 2011).

As espécies de *Bacillus* podem produzir metabólitos secundários, os quais, exercem funções ecológicas importantes como, por exemplo, resistência sistêmica e promoção de crescimento vegetal; atividades antimicrobianas; estimulação da esporulação; modulação da expressão gênica; indução da motilidade e formação de biofilmes e sinalização e diversificação (TYC et al., 2017)

A Food and Drug Administration (USFDA) deu aos *Bacillus* spp. o status de bionematicidas seguros (USTA, 2013), pois são inócuos à humanos, animais e outros

organismos que vivem no solo (GAO et al., 2016). Somando-se a isso, outras características também são excelentes, como o rápido crescimento, o fácil manuseio e colonização robusta da rizosfera (SARAF et al., 2014).

Os *Bacillus* spp. que já foram estudados no controle biológico de nematoides têm alguns mecanismos de ação, porém ainda existe pouco conhecimento sobre a totalidade desses mecanismos, sendo *B. thuringiensis*, *B. megaterium* e *B. nematocida* são os mais compreendidos (HUANG et al., 2010; LI et al., 2015). As enzimas proteases, quitinases, colagenases e lipases, também exercem ação contra nematoides (CASTANEDA-ALVAREZ; ABALLAY, 2016).

Atividades nematicidas em relação as enzimas são pela composição do corpo do nematoide e também dos ovos serem de colágeno e quitina, respectivamente. As proteases podem hidrolisar ligações peptídicas e as quitinases as cadeias de polissacarídeos de N-acetil-D-glucosamina (CASTANEDA-ALVAREZ & ABALLAY, 2016). Já colagenase pode atuar diretamente sobre a cutícula do corpo dos nematoides, pois toda a extensão corporal destes é formada por colágeno, assim as colagenase têm um antagônico (CASTANEDA-ALVAREZ; ABALLAY, 2016; ABALLAY et al., 2017).

Outra característica muito importante dos *Bacillus* spp. é a promoção do crescimento de plantas, no entanto nem todas as espécies de *Bacillus* possuem esse mecanismo. A promoção de crescimento vegetal ocorre por meio da ação de auxinas como o ácido indolacético (AIA), giberilina e citocinina (LANNA-FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Além disso, pode ocorrer a solubilização de fósforo e a produção de ácido indolacético, promovendo o alongamento celular, conseqüentemente com o maior tamanho da parte área e da raiz frente a plantas sem a bactéria (CONRATH et al., 2015).

O nitrogênio pode ser transformado do estado indisponível para a forma disponível de modo que as raízes das plantas consigam absorver o nitrogênio não lábil, contribuindo assim no crescimento das plantas, como já relatado para algumas espécies de *Bacillus* (LIU et al., 2016).

Além disso, algumas espécies de *Bacillus* podem produzir sideróforos, ou seja, sequestram o ferro disponível no solo, reduzem a forma férrica para a forma ferrosa, podendo ser facilmente absorvido pelo sistema radicular das plantas (DERTZ;

STINTZI, RAYMOND, 2006), tal característica é essencial para bactérias competidoras.

2.4 Gênero *Pseudomonas* Migula, 1894

As espécies de *Pseudomonas* Migula estão entre os microrganismos mais estudados e adequados para biotecnologia agrícola. Essas bactérias englobam espécies de interesse fitopatológico, médico e ambiental (KORSHUNOVA et al., 2021). Taxonomicamente pertencem ao reino Bacteria, sub-reino Negibacteria, classe Proteobacteria, ordem Gammaproteobacteria, família Pseudomonadales e gênero *Pseudomonas* (CAVALIER-SMITH, 2002; GARRITY et al., 2005; ORLA-JENSEN, 1921; WINSLOW et al., 1917; MIGULA, 1894).

Algumas cepas de espécies de *Pseudomonas* podem colonizar a rizosfera em alta densidade, competir com outros microrganismos com sucesso e produzir metabólitos secundários com poderosa atividade antifúngica, como 2,4-diacetilfloroglucinol (Phl). Phl é um antimicrobiano de amplo espectro produzido por uma variedade de *Pseudomonas fluorescens* e outras espécies, tem atividade biológica contra uma variedade de patógenos de plantas fúngicos e bacterianos (MORRISSEY et al., 2004).

Outros atributos como, por exemplo, síntese de metabólitos antimicrobianos de diferentes estruturas (fenazinas, cianeto de hidrogênio, amônia, biossurfactantes) (CHEN et al., 2017; MONNIER et al., 2018), indução de sistemas de defesa nas plantas pela produção de substâncias como ácidos salicílico e jasmônico, sideróforos, lipopolissacarídeos, compostos orgânicos voláteis (cetonas, pirazinas e compostos contendo enxofre, além de outras substâncias (KORSHUNOVA et al., 2021) e também síntese de enzimas líticas (quitinases, glucanases, peptidases), que hidrolisam quitina, beta glucanas e proteínas, resulta na supressão direta do crescimento e desenvolvimento do patógeno ou na liberação de indutores endógenos secundários de resistência (oligossacarídeos, quitosana) (KORSHUNOVA et al., 2021).

Além disso, algumas cepas de *Pseudomonas* podem produzir 2,4-diacetilfloroglucinol, metaloproteinase alcalina AprA, dimetil-dissulfeto, 2-nonanona, 2-octanona, acetato de (Z) -hexen-1-ol e 2-undecanona (SIDDIQUI, HAAS; HEEB, 2005; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003; ZHAI et al., 2018)

A supressão de nematoides por espécies de *Pseudomonas* tem amplo relato para muitas espécies de nematoides, entre eles os nematoides-das-galhas. Experimentos com *Pseudomonas fragi* Sneb1990 cepa endofítica (WANG et al., 2021) *in vitro*, casa de vegetação e em campo relatam a supressão de *M. incognita* pela produção do peptídeo flagelina, tendo como efeito secundário a promoção de crescimento em tomateiro.

P. protegens cepa Sneb1997 foi constatada como um novo agente de controle biológico, pois os resultados foram promissores com a mortalidade de J₂, efeitos ovicidas e supressão na reprodução de *M. incognita* em estudos de laboratório, casa de vegetação e experimentos por dois anos em condições de campo (ZHAO et al., 2021).

A espécie *P. pudita* cepa 1A00316 isolada de solo antártico tem efeitos nematicidas na eclosão e mortalidade de J₂ de *M. incognita*. Essa espécie produz compostos orgânicos voláteis (COVs), entre eles dimetil-dissulfeto, 2-nonanona, 2-octanona, (Z)-hexen-1-ol acetato e 2-undecanona, com ação nematicida direta sobre J₂, além disso outros dois compostos: 1-undeceno e 1-(eteniloxi)-octadecano inibiram a eclosão de J₂ por efeito fumigante (ZHAI et al., 2018). Porém, outros estudos em casa de vegetação e condições de campo necessitam ser realizados para entendimento do comportamento desta bactéria e seu potencial como agente de controle biológico.

A espécie *P. fluorescens* CHAO em condições de casa de vegetação suprimiu a reprodução de *M. incognita* em plantas de tomate e soja, essa redução foi significativa, quando comparado com o nematicida carbofurano e outras cepas da mesma espécie. O mecanismo de biocontrole relatado para esta cepa foi a produção de protease AprA, uma enzima extracelular (SIDDIQUI; HAAS; HEEB, 2005; SIDDIQUI; SHAHID SHAUKAT, 2003).

Uma espécie, provavelmente, *P. lini*, uma cepa endofítica foi relatada como um novo possível agente de biocontrole de *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* e de *M. incognita* na cultura do orégano em condições áridas (África), com altos teores de sais não sódicos e alumínio. Além disso, a cepa atua na fixação nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de AIA, sideróforos com efeitos de promoção de crescimento em tomateiro (MUÑOZ TORRES et al., 2021).

A espécie *P. simiae* MB751 isolada de campos de vinhedo foi testada contra J₂ de *M. incognita*. Foi constatado que a cepa desta espécie produz um dipeptídeo cíclico

Cyclo (L-Pro-L-Leu) com efeito nematicida, além disso, a cepa promoveu o crescimento e resistência sistêmica em tomate (SUN et al., 2021). No entanto, para ser considerada como um agente de biocontrole necessita passar por testes rigorosos em condições de campo.

Portanto, sabe-se que as espécies de *Pseudomonas* são bactérias Gram-negativas e muitas como, por exemplo, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. protegens* e *P. chlororaphis* atuam como agentes de biocontrole, suprimindo a população de diversos grupos de patógenos que habitam o solo, incluindo oomicetos fúngicos, bacterianos e alguns nematoides parasitas de plantas, por exemplo, espécies do gênero *Meloidogyne*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização dos experimentos

A pesquisa foi desenvolvida nas dependências do Departamento de Proteção Vegetal – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na cidade Botucatu, São Paulo, Brasil e no Laboratório de Controle Biológico do Centro avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal (CAPSA) do Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, Brasil.

3.2 Preparo de substrato e inóculo de *Meloidogyne incognita*

Um substrato composto por uma mistura de terra, areia e material orgânico na proporção 1:2:1 foi esterilizado por 1 h a 121 °C e após resfriamento natural, foi adicionado em vasos plásticos (20 x 20 x 17 cm) com capacidade para 5 litros. O transplântio de mudas de tomateiro ‘Santa Cruz Kada Gigante’ foi realizado com 30 dias após a emergência (BCH 25–35) e após cinco dias, essas plantas foram inoculadas com *Meloidogyne incognita* com uma população de 4.000 ovos + J₂ mL⁻¹. O ajuste populacional foi realizado por meio de um microscópio ótico [Leica MICROSYSTEMS, modelo DM750 (leica-microsystems.com)] com auxílio de uma lâmina de Peters (SOUTHEY, 1970). A inoculação de 1mL da suspensão do nematoide por planta foi realizada em dois orifícios de 3 ± 1 cm de profundidade próximos a base do caule das plantas, em lados opostos. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e as plantas foram irrigadas diariamente, mantendo o solo na capacidade de campo (60–70%) por 60 dias.

3.3 Obtenção dos juvenis

Após 60 dias da inoculação, os ovos de *M. incognita* foram extraídos das raízes do tomateiro, utilizando para isso uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e um liquidificador na menor rotação por 40 segundos. A suspensão extraída foi vertida em peneiras de 250, 47 e 25 µm sobrepostas, com lavagens sucessivas, utilizando água de torneira. Com essa suspensão de ovos foram preparadas câmaras de eclosão, segundo a metodologia descrita por Whitehead e Hermming (1965), em que se utiliza

recipientes rasos e uma peneira coberta de papel absorvente e adição da suspensão de ovos, mantida em câmara de temperatura controlada a 27 ± 2 °C. Após 24 horas de incubação, a primeira suspensão foi recolhida cuidadosamente e os eventuais J_{2s} foram descartados. As suspensões depois de 48 horas de incubação, foram recolhidas e utilizadas nos bioensaios. Esse processo de recolhimento se repetiu a cada 24 horas, se estendendo até 10 dias. O processo de montagem de câmaras de eclosão e recolhimento de J_2 foi repetido em todas as etapas da pesquisa (I, II, III e IV), aproximadamente 309.400 J_2 de *M. incognita* foram utilizados durante o estudo.

3.4 Obtenção dos isolados bacterianos

Cento e um isolados de bactérias oriundos da coleção de microrganismos do Laboratório de Controle biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal (CAPSA) do Instituto Biológico foram estudados. A coleção encontrava-se preservada (criopreservação). Os isolados de bactérias foram inoculados em meio NB (Nutrient Broth) previamente esterilizado (20 minutos a 121 ± 2 °C) e, posteriormente levados para incubação sobre uma mesa agitadora orbital a 180 rpm por 72 horas, até atingirem aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC). Esses processos foram repetidos em todas as etapas da pesquisa.

3.5 Etapa I – “Screening” *in vitro*

O “screening” da primeira etapa foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em duplicata, tendo como testemunhas, água destilada esterilizada e meio NB. Durante os bioensaio foram utilizadas placas de Petri de seis mm de diâmetro, contendo 12 g de areia sílica (0,5 a 1,0 mm), em cada uma delas, previamente esterilizadas por 20 minutos a 121 ± 2 °C

Suspensões de J_{2s} com 1.000 μ L do nematoide com 24 h de vida foram inoculadas nas placas Petri e logo após uma suspensão bacteriana de 1.000 μ L foi adicionada. As placas foram seladas com plástico filme (PVC) e acondicionadas em câmara de temperatura controlada (25 ± 2 °C) por 24 horas, após esse período a areia de cada placa foi lavada com água de torneira sobre peneiras de 420 e 25 μ m, sobrepostas. A suspensão retida na peneira de 25 μ m foi recolhida com um auxílio de uma pipeta de Pasteur, pipetando 500 μ L por vez até completar 2.000 μ L. A partir

deste volume, foi utilizado 1.000 µL para observação e avaliação em lâminas de Peters, adicionou-se 12 µL de NaOH a 1 M (XIANG; LAWRENCE, 2016). A confirmação da mortalidade foi por meio da observação de nematoides com formato retilíneo e sem movimento após a adição de NaOH. O percentual de mortalidade de J₂ foi calculado a partir da fórmula abaixo:

$$Mortalidade (\%) = \frac{Nm}{Nte} \times 100 \quad (1)$$

Onde, Nm é o número de nematoides mortos e Nte é o número de nematoides total depois da inoculação, após 24 horas de exposição à suspensão bacteriana.

3.6 Etapa II – Mortalidade de *Meloidogyne incognita* x tempo

Após todo o processo de “screening” da primeira etapa, os dados foram computados e a mortalidade para cada isolado foi calculada. Desta forma, foi possível selecionar 09 isolados (311a, 321b, MA07, 287a, 195b, CB01, 388b, 268, Cromo NA), que resultaram com uma mortalidade igual ou maior a 50%. Um novo “screening” *in vitro* foi planejado com o objetivo de selecionar os isolados mais promissores com uma concentração de 10% da suspensão bacteriana em três tempos diferentes (24, 48, 72 h). O delineamento experimental seguiu da mesma forma descrita na etapa I. Suspensão de J₂ e dos isolados foram adicionadas em tubos de ensaio com alíquotas de 1.800 µL e de 200 µL, respectivamente. Após homogeneização os 2.000 µL finais foram transferidos para placas de Petri, conforme a metodologia descrita na etapa I. As placas de Petri foram seladas com plástico filme (PVC) e acondicionadas a 25 ± 2 °C. A obtenção dos J_{2s} e as avaliações foram conforme descrito na seção 3.5.1

3.7 Etapa III – Concentrações letais

A partir da etapa anterior cinco isolados (311a, 321b, MA07, 287a e 195b) foram selecionados como os mais promissores. E um novo bioensaio foi programado com o objetivo de avaliar a mortalidade do J₂ com sete concentrações da suspensão bacteriana dos isolados selecionados, utilizando uma população de 500 J₂/mL⁻¹. Assim, um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, em duplicata, foi instalado com as seguintes concentrações: 1) 1.000 µL de água destilada e 1.000 µL da suspensão de J₂ (0%); 2) 40 µL suspensão bacteriana + 1.960 µL da suspensão

de J₂ (2%); 3) 80 + 1.920 (4%); 4) 140 + 1.860 µL (7%); 5) 200 + 1.800 µL (10%); 6) 300 + 1.700 µL (15%); 7) 400 + 1.600 µL (20%), respectivamente. As suspensões foram adicionadas em tubos de ensaio de 15 mL. Após homogeneização os 2.000 µL finais foram transferidos para placas de Petri, conforme a metodologia escrita na etapa I. Após 92 h da inoculação dos J_{2s} foi conforme descrito na seção 3.5.1, com a avaliação da mortalidade.

3.8 Etapa IV – experimentos *in vivo*

3.8.1 Controle *in vivo* de *Meloidogyne incognita*

Esta etapa foi composta de um experimento em delineamento inteiramente casualizado para avaliação do controle *in vivo* de *M. incognita*. O ensaio foi realizado com os seguintes isolados: 311a, 321b, MA07, 287a e 195b, cada isolado foi testado nas concentrações de 5 e 15% da suspensão bacteriana (T1-água; T2-5%-NB; T3-15%-NB; T4-311a-5%; T5-287a-5%; T6-321b-5%; T7-MA07-5%; T8-195b-5%; T9-311a-15%; T10-287a-15%; T11-321b-15%; T12-MA07-15% e T13-195b-15%), totalizando 13 tratamentos, incluindo três testemunhas, com quatro repetições, em duplicata. Plantas de tomateiro cv. Santa Cruz com 28 dias após a semeadura, foram transplantadas para vasos de 5 L (20 x 20 x 17 cm) sobre um substrato composto de solo, areia e esterco (1:2:1). Após o processo de transplante foi realizada a inoculação de 1.000 J_{2s} do nematoide, em dois orifícios equidistantes com 2 ± 3 cm de profundidade, ao lado de cada planta. Logo após a inoculação dos nematoides foi realizada a inoculação das bactérias, com suas respectivas concentrações, cada planta recebeu 20 mL de cada concentração para cada tratamento. As plantas não receberam adubação mineral.

3.8.2 Promoção de crescimento vegetal

A promoção de crescimento vegetal foi realizada por meio de um experimento em delineamento inteiramente casualizado, com 13 tratamentos e quatro repetições, em duplicata, com os seguintes isolados (311a, 321b, MA07, 287a e 195b) nas mesmas concentrações do experimento de controle de nematoides. No entanto, as plantas neste experimento não foram inoculadas com nematoides, receberam apenas

os 20 mL das concentrações de cada isolado de bactéria. As plantas de tomate foram transplantadas para vasos de 5L (20 x 20 x 17 cm) sobre um substrato composto de solo, areia e esterco (1:2:1). Após o transplante, foi aplicado os tratamentos: (T1-água; T2-5%-NB; T3-15%-NB; T4-311a-5%; T5-287a-5%; T6-321b-5%; T7-MA07-5%; T8-195b-5%; T9-311a-15%; T10-287a-15%; T11-321b-15%; T12-MA07-15% e T13-195b-15%). As plantas não receberam adubação mineral.

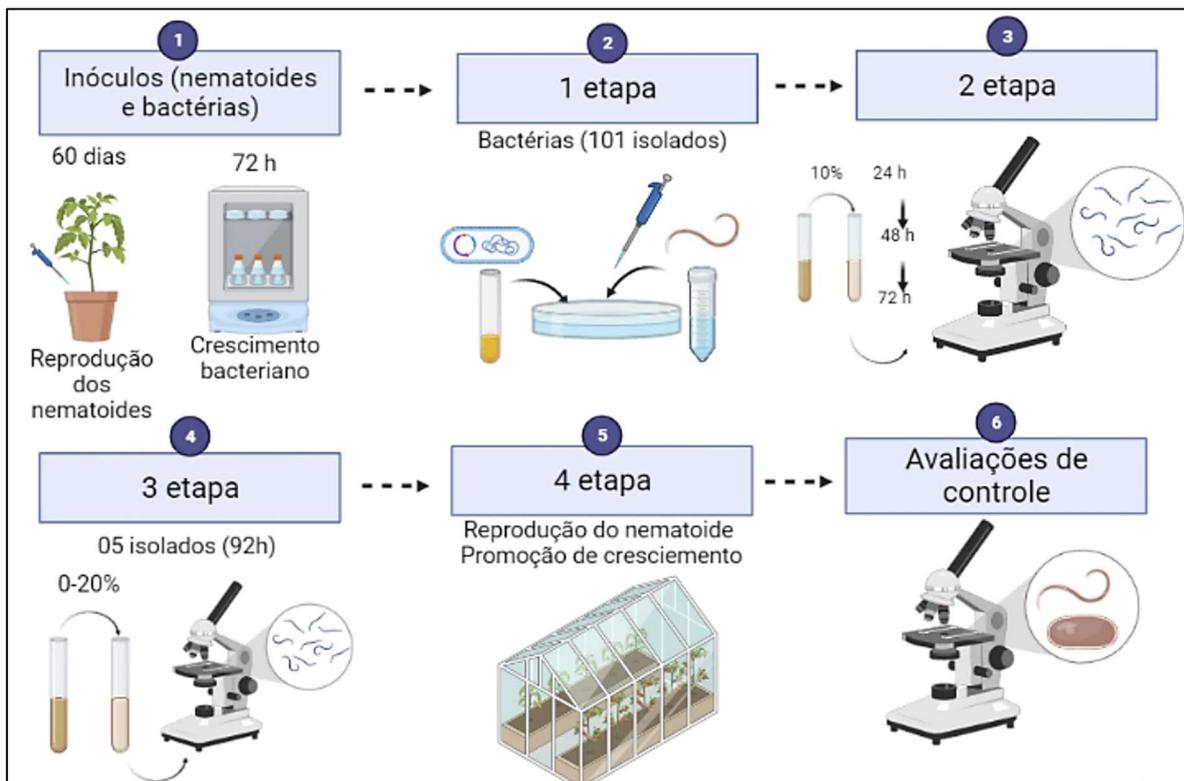
3.9 Avaliações nematológicas e vegetativas

As avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação, com a retirada das plantas e suas respectivas raízes. As raízes foram retiradas dos vasos e lavadas cuidadosamente e depois seguiu-se com a extração de nematoides, utilizando 250 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e um liquidificador na menor rotação por 30 segundos. A suspensão resultante foi vertida sobre peneiras de 250 e 25 μm , sobrepostas, recolhendo-se a suspensão da peneira de 25 μm . A quantidade de ovos + J₂ por grama de raiz (NGR) foi obtida por meio de contagem em lâminas de Peters em microscópio com aumento de 10x. As demais variáveis como altura da parte aérea (APA), comprimento da raiz (CR), diâmetro do caule (DC) em centímetros, massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR) e massa fresca seca da raiz (MSR) em gramas, foram aferidas tanto no experimento de controle de nematoides como também no experimento de promoção de crescimento vegetal, exceto MSR do experimento de controle de nematoide, pois a raiz foi completamente processada para extração de nematoides. As raízes foram cortadas em pedaços de cerca de 1,0 cm de comprimento, trituradas em liquidificador (600 W) por 30 segundos, com solução de água e hipoclorito de sódio a 0,5%. O material obtido foi passado em peneiras 42 μm e 25 μm , sobrepostas, os ovos e J_{2s} retidos na peneira de 25 μm foram recolhidos com auxílio de pisseta com água (BONETI; FERRAZ, 1981), a contagem foi em lâmina de Peters, sob um aumento de 10x em microscópio ótico.

As etapas de seleção de bactérias para obtenção de isolados promissores no manejo biológico de nematoides parasitas de plantas, especialmente os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) seguiram as metodologias apresentadas na seção 3. Assim, foi possível elaborar um fluxograma detalhado e ilustrativo de todas as etapas realizadas, essas foram idealizadas para atender uma representatividade das

condições mais próximas do habitat dos nematoides (I, II, III). Além disso, todas as etapas são simples e executáveis, podendo ser aplicadas para todos os gêneros de nematoides parasitas de plantas na fase de juvenil infectante (J₂) (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma das etapas de seleção de bactérias para controle biológico de nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* sp.)



1 etapa= "screening" *in vitro* utilizando areia sílica (12g por placa) e 1 mL da suspensão de nematoides (100 J₂), 1 mL da suspensão bacteriana de 101 isolados (72 horas de crescimento); 2 etapa = segundo "screening" *in vitro* utilizando 09 isolados sob concentração de 10% da suspensão bacteriana em três tempos (24, 48 e 72 h); 3 etapa = terceiro "screening" utilizando apenas cinco isolados em diferentes concentrações (0; 2; 4; 7; 10; 15 e 20%) com avaliação realizada após 92 h; 4 etapa = "screening" *in vivo* com cinco isolados (311a, 321b, MA07, 287a e 195b) sob uma concentração de 5 e 15% [(13 tratamentos (três testemunhas – água, 5 e 15% de NB)); avaliação do controle de nematoides (ovos + J₂) e promoção de crescimento vegetal (tomate cv. Santa Cruz) após 60 dias da inoculação do (nematóide + isolados) e dos (isolados sem nematoides), respectivamente.

3.10 Análise estatística

Na primeira etapa foi calculada a mortalidade de J₂ de *M. incognita* e a quantidade de isolados, para representação gráfica em termos percentuais. Já os dados da segunda etapa e terceira, foram analisados com base na teoria dos modelos lineares generalizados e extensões (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Desse modo,

para a etapa II, ajustou-se o modelo quase-binomial, para as proporções de mortalidade, utilizando a função de ligação probit, porque os dados mostraram superdispersão (DEMÉTRIO; HINDE; MORAL, 2014). As comparações foram por meio do teste Tukey, utilizando as bibliotecas “emmeans” e “multcomp”. As médias foram consideradas diferentes estatisticamente, quando o $p < 0,05$ e não significativas $p > 0,05$.

Na terceira etapa, a variável resposta proporção de mortalidade foi modelada, utilizando o modelo quase-binomial com função de ligação logit. Calculou-se as estimativas de concentrações letais (CL_{50} e CL_{70}) e seus intervalos de confiança com 95% de confiança (IC_{95}) com o auxílio da biblioteca “MASS”, utilizando método delta.

Para verificar a qualidade de ajuste II e III, utilizou-se o gráfico semi-normal de probabilidades com envelope simulado foi utilizado para verificar a adequação dos modelos ajustados, usando a biblioteca “hnp” (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017).

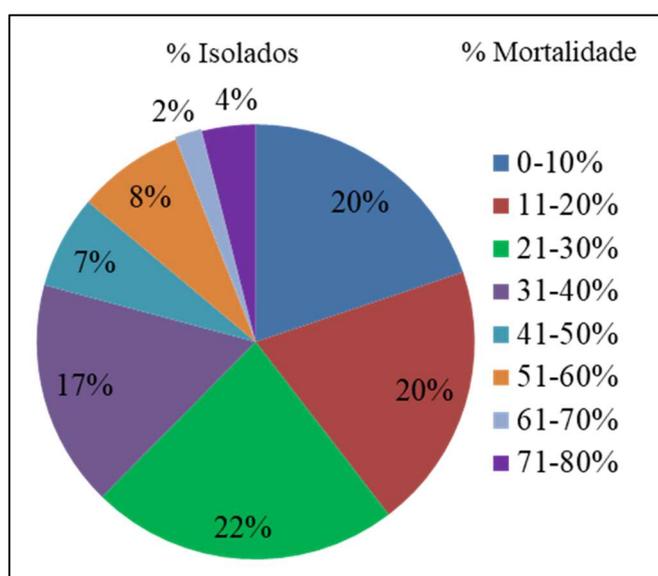
Os dados obtidos na etapa IV, inicialmente, foram analisados quanto às pressuposições de homogeneidade de variâncias, empregando o teste de Bartlett e normalidade dos resíduos, por meio do teste de Shapiro-Wilk. A partir desta avaliação, constatou-se que, apenas, os dados das variáveis APA, MFPA, MSPA seguiriam as pressuposições relatadas anteriormente, para isso foi realizado transformação box-cox, quando necessário. No entanto, as variáveis CR, DC e NGR não seguiam as pressuposições de homogeneidade de variâncias e normalidade de resíduos, sendo utilizado, portanto, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p=0,05$). As demais médias foram comparadas, pelo teste de Duncan ($p=0,05$). As análises das etapas II, III e IV foram feitas no software R (R CORE TEAM, 2018).

4 RESULTADOS

4.1 Etapa I – “Screening” *in vitro*

A diversidade de bactérias, que foram submetidas à primeira etapa resultou em 86% de isolados, com mortalidade de J₂ abaixo ou igual a 50%. Essa representatividade é composta de 87 isolados com percentuais de mortalidade variando de (0–10; 11–20; 21–30; 31–40 e 41–50%). Entre as variações de mortalidade, aquela com menor percentual de representação de isolados está em 41–40%, ou seja, apenas sete isolados (Figura 2).

Figura 2 – Porcentagens de mortalidade de J₂ e de isolados testados



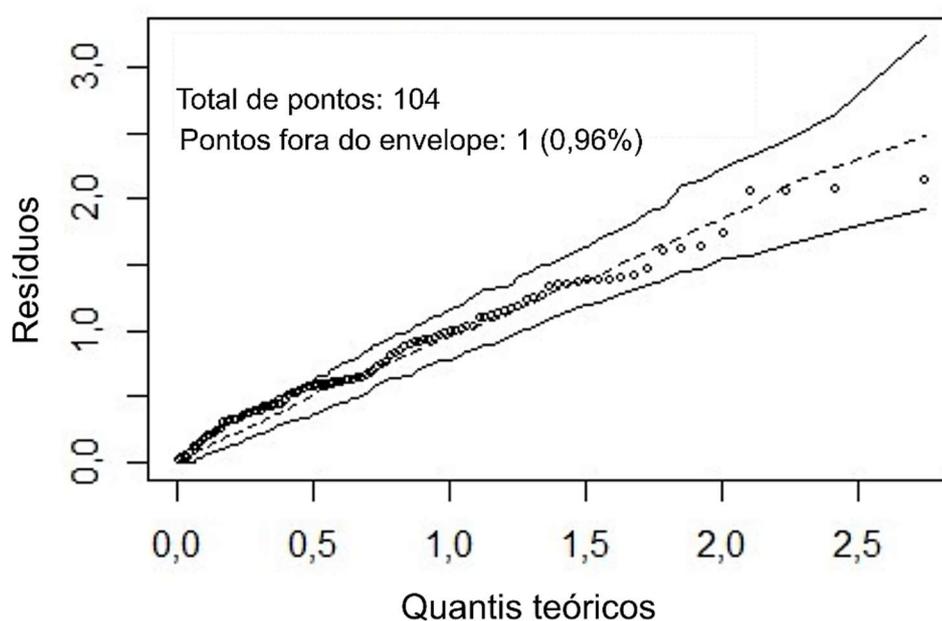
Mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* após 24 horas, em areia sílica a 25 ± 2 °C.

A seleção de bactérias para segunda etapa levou em consideração aquelas que causaram mortalidade acima de 50% dos J_{2s} de *M. incognita* (14% dos isolados testados). Esses 14% representam um total de 20 isolados, mas apenas 9% (09 isolados) (Figura 2) prosseguiram para segunda etapa, pela possibilidade de realização de estudos em diferentes tempos e concentrações de suspensão bacteriana.

4.2 Etapa II – Mortalidade de *Meloidogyne incognita* x tempo

A mortalidade de J₂ após 24, 48 e 72 horas de exposição à suspensão bacteriana de cinco isolados na concentração de 10% (195b; 287a; MA07; 321b; 311a) foi melhor ajustada pelo modelo quase-binomial, tendo no máximo 0,96% de pontos fora do envelope de simulação (Figura 3).

Figura 3 – Ajuste do modelo-quase binomial para mortalidade de J₂ (isolados x tempo)



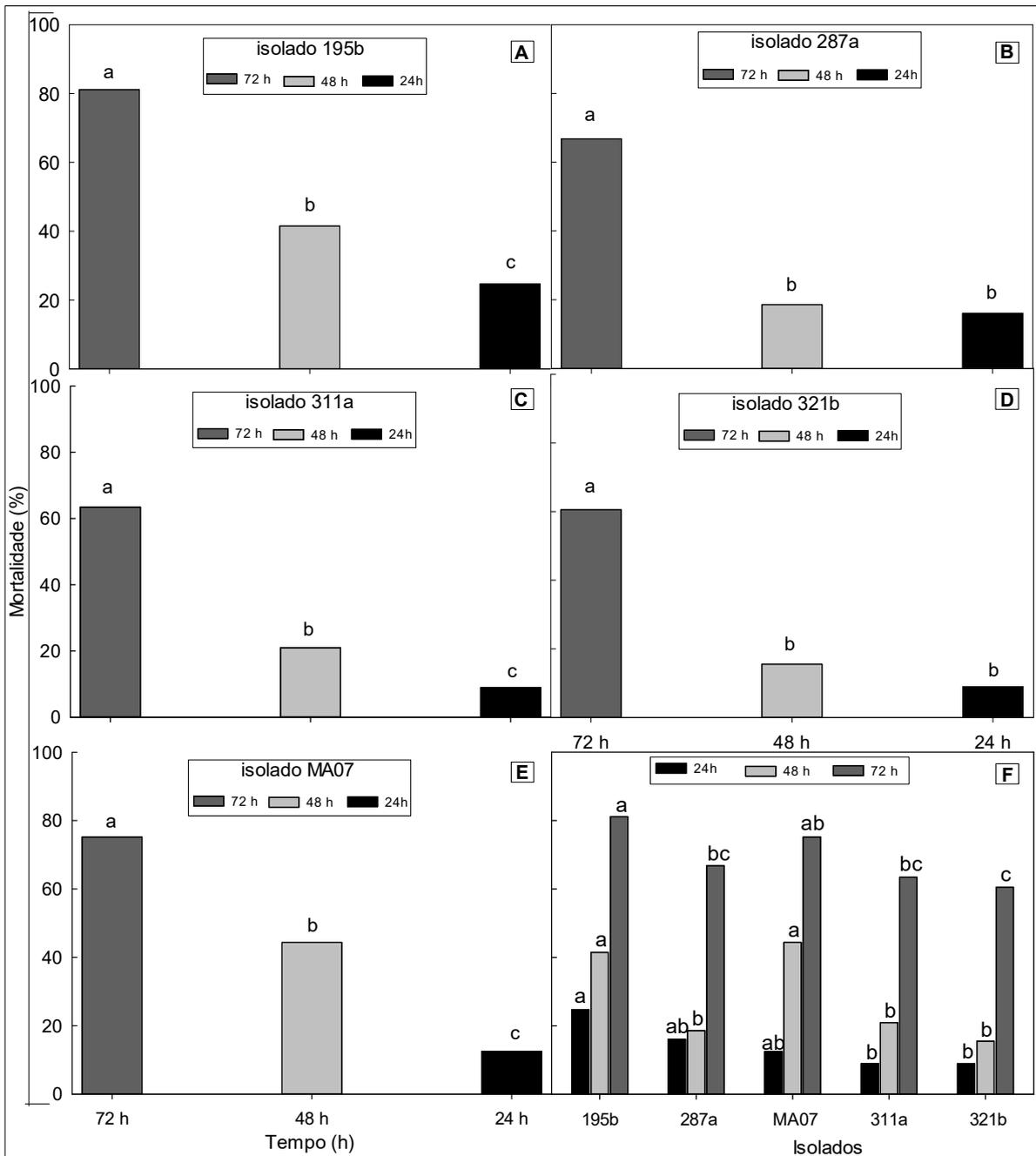
Pela análise estatística por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$) foi constatado que houve diferenças estatísticas na mortalidade de J₂, entre os isolados e entre os tempos de exposição (Figura 4).

A mortalidade de J₂ pelo isolado 195b foi crescente após 24, 48 e 72 horas, sendo o tempo de 72 h, com o maior percentual de nematoides mortos ($p < 0,05$) (Figura 4A).

Os efeitos na mortalidade de J₂ com a inoculação do isolado 287a foi diferente após 72 h ($p < 0,05$), sendo que os tempos de 24 e 48 h, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) (Figura 4B).

O isolado 311a causou uma maior mortalidade, após 72 h, ($p < 0,05$) (Figura 4C), não diferindo dos de 24 e 48 h.

Figura 4 – Mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* após 24, 48 e 72 horas



A= isolado 195b; B= 287a; C= 311a; D= 321b; E= MA07; F= comparação entre isolados com 24, 48 e 72 h, após a inoculação com uma concentração de 10% da suspensão bacteriana. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os efeitos de horas sobre a mortalidade de J₂, com a inoculação do isolado 321b não foi diferente estatisticamente às 24 e 48 h ($p > 0,05$), porém após 72 h, os efeitos foram significativos ($p < 0,05$) (Figura 4D).

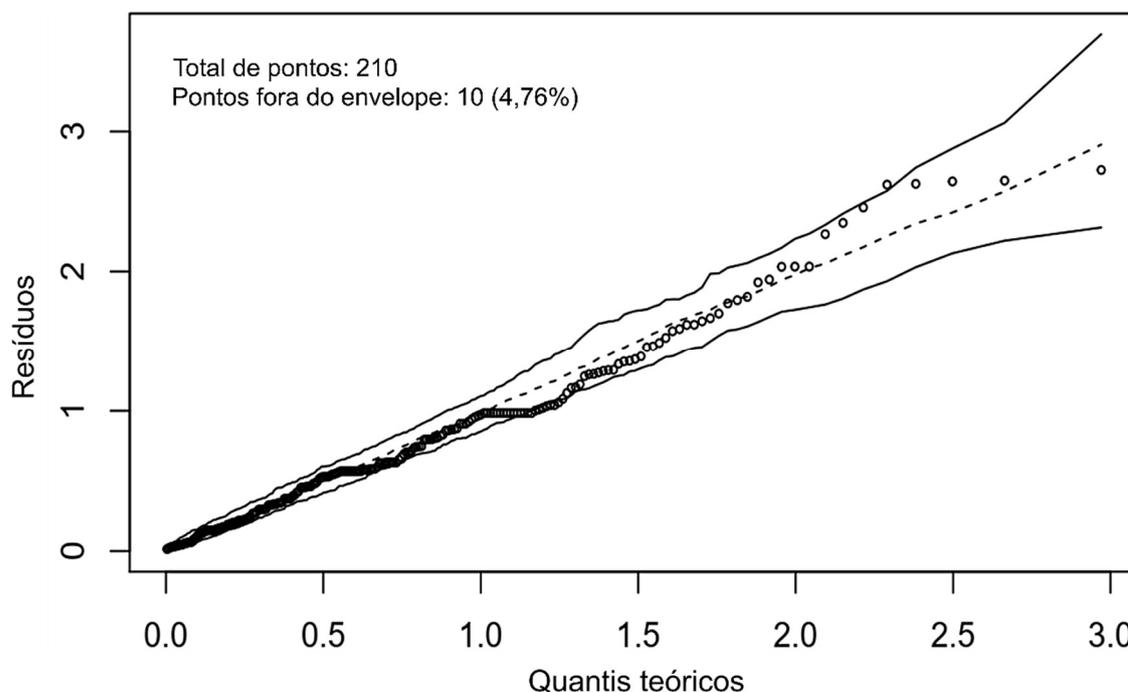
Já com o isolado MA07 a mortalidade de J₂ apresentou diferenças ($p < 0,05$) para os três tempos avaliados, no entanto a maior mortalidade ocorreu após 72 h, da inoculação.

A mortalidade de J₂, após 24 h, foram maiores nos isolados 195b, 287a e MA07 ($p > 0,05$). Após 72 h, a mortalidade foi maior nos tratamentos com os isolados 195b e MA07 ($p > 0,05$), diferindo estatisticamente em relação à 321b ($p < 0,05$).

4.3 Etapa III – Concentrações x mortalidade de *Meloidogyne incognita*

A mortalidade de J₂ de *M. incognita* com diferentes concentrações dos isolados bacterianos, foram melhor ajustadas, estatisticamente, pelo modelo quase-binomial, com menos de 5% de pontos fora do envelope de simulação (Figura 5).

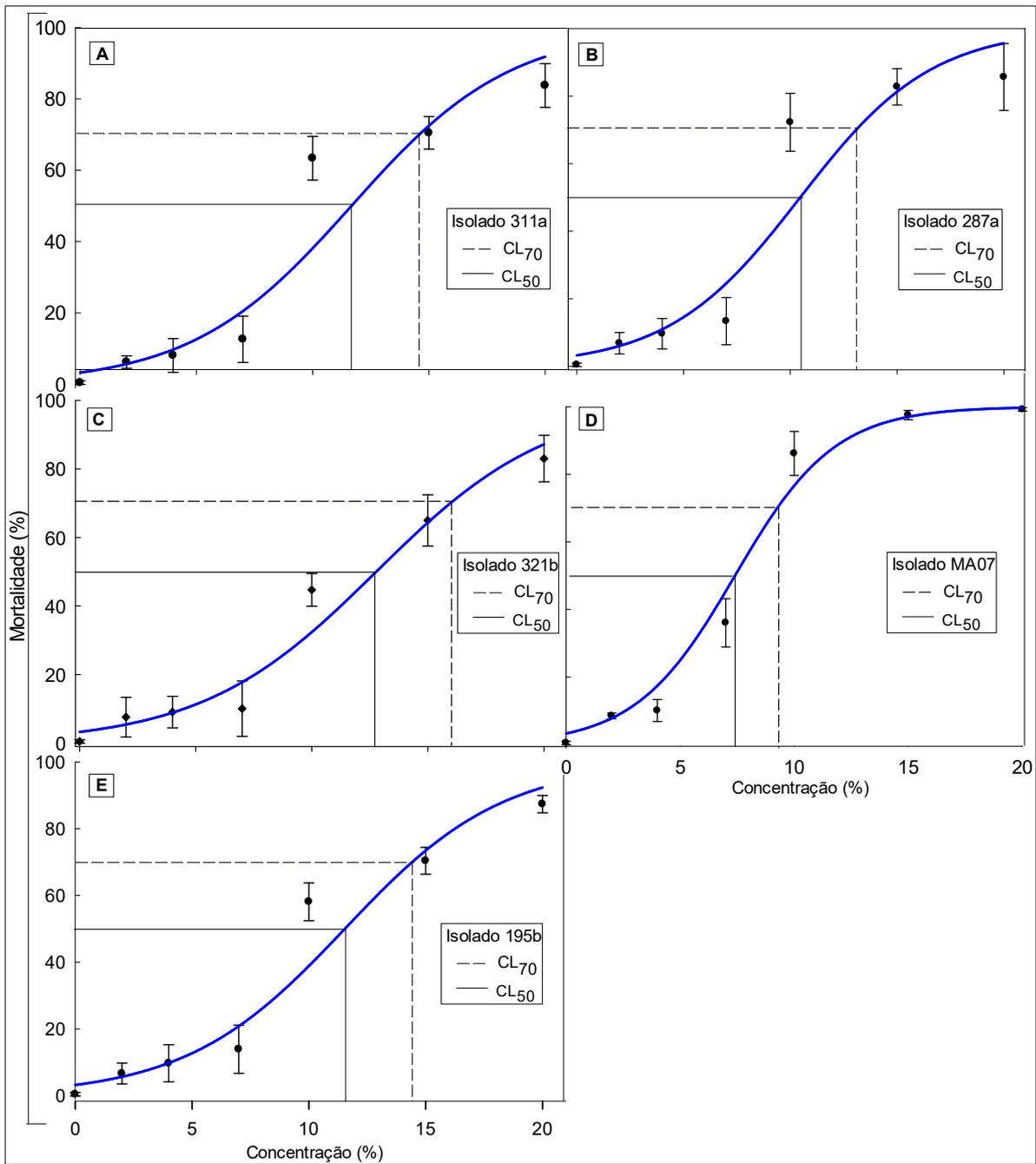
Figura 5 – Ajuste do modelo quase-binomial para mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita*



Os pontos são os dados obtidos durante o experimento de diferentes concentrações (0-20%) da suspensão bacteriana e mortalidade de J₂ de *M. incognita* após 92 horas, a uma temperatura de 25 °C.

As estimativas das CL₅₀ e CL₇₀ foram plotadas em gráficos, sendo o eixo 'y' o percentual de mortalidade de J₂ e o eixo 'x' as concentrações testadas e as linhas tracejadas em direção a linha não tracejada identificam a mortalidade versus a concentração letal (Figura 6).

Figura 6 – Mortalidade de J₂ de *Meloidogyne incognita* (%) e estimativas de CL₅₀ e CL₇₀ (%)



Isolados 311a (A); 287a (B); 321b (C); MA07 (B) e 195b (D). As setas indicadas são referências das concentrações letais (CL₅₀ e CL₇₀) de mortalidade do nematoide após 92 horas de exposição a uma temperatura de 25 °C.

O isolado MA07 ficou com a menor concentração da suspensão bacteriana no percentual de mortalidade de 50 e 70% da população de J₂ do nematoide, portanto, diferente estatisticamente dos demais isolados com base nos intervalos de confiança (Tabela 1). Na CL₇₀ o mesmo isolado causou a mortalidade de 70% de J₂ do nematoide com 9,26% de concentração da suspensão bacteriana (Figura 6)

Tabela 1 – Intervalos de confiança (IC), inferior e superior, com 95% de confiança para cinco isolados testados na mortalidade de J₂ de *M. incognita* após 92 horas a 25 °C

Isolado	IC ₅₀		IC ₇₀	
	Inferior	superior	inferior	superior
311a	10,86	12,48	13,57	15,60
287a	9,73	11,19	12,16	13,07
321b	11,88	13,67	14,84	17,10
MA07	6,87	7,94	8,58	9,92
195b	10,73	12,34	13,41	15,42

*Médias de CL₅₀ e CL₇₀ acompanhadas de intervalos de confiança (IC_{inferior} e IC_{superior}) não diferem entre si com base na sobreposição destes intervalos.

O isolado 287a é o segundo com as menores concentrações para CL₅₀ (10,46%) e CL₇₀ (13,08%) (Figura 6), ficando atrás somente do isolado MA07. A CL₅₀ para o isolado 287a é de 3,06% maior que o isolado MA07 e 2,32% menor quando comparado com o isolado 321b (12,78%), esse com a maior concentração estimada entre os cinco isolados.

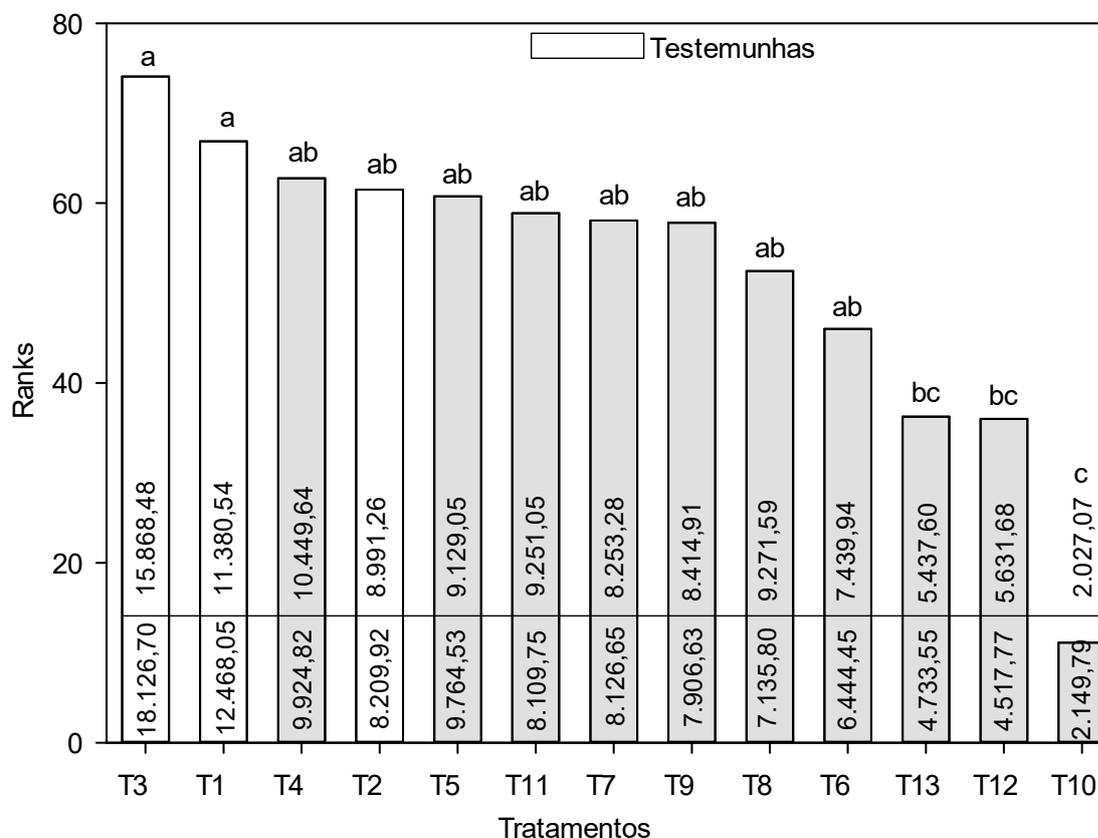
A CL₇₀ do isolado 287a também foi estimada como a segunda menor (13,08%), porém sem diferença estatística entre os isolados (311a, 321b e 195b) com base nos intervalos de confiança. Enquanto isso, a CL₇₀ do isolado 321b foi a maior (15,97%), uma porcentagem próxima da maior concentração testada (20%) (Figura 6).

4.4 Etapa IV – Experimentos *in vivo*

4.4.1 Controle *in vivo* de *Meloidogyne incognita*

O experimento *in vivo* com uma população de 1.000 J₂/planta de *M. incognita* e diferentes isolados de bactérias com concentrações de 5 e 15% inoculados em tomateiro cv. Santa Cruz, com avaliação realizada após 60 dias, resultaram em valores que não seguiram normalidade e homoscedasticidade, sendo submetidos ao teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis). Os tratamentos foram ranqueados de acordo com seus valores de ranks (Figura 7) dados pela análise estatística não-paramétrica.

Figura 7 – Nematoides por grama de raiz (NGR) ovos + J₂ aos 60 dias após a inoculação de 1.000 J₂ de *M. incognita* em tomateiro cv. Santa Cruz



T1 (água), T2 (NB-5%), T3 (NB-15%), T4 (311a-5%), T5 (287a-5%), T6 (321b-5%), T7 (MA07-5%), T8 (195b-5%), T9 (311a-15%), T10 (287a-15%), T11 (321b-15%), T12 (MA07-15%) e T13 (195b-15%). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Valores abaixo e acima da linha horizontal são as medianas e médias, respectivamente

A quantidade de ovos + J₂ de *M. incognita* por grama de raiz foi maior nas testemunhas, água T1 [11.380,54 ± 6.726,60; (média ± desvio padrão)] e meio T3 [NB 15% (15.868,5 ± 9.751,92)], não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) de T4 e T2 (Figura 7).

Os tratamentos T13, T12 e T10 são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) de T1, T2 e T3. A menor população foi em T10 com (2.027,07 ± 754,91) com diferença de 13.841,43 ovos + J₂ do nematoide, por grama de raiz em relação a testemunha T3.

Os tratamentos T13 (5.437,60 ± 3.399,34) e T12 (5.631,68 ± 2.509,58) em relação a T10 não diferem estatisticamente. Nos demais tratamentos T5, T6, T7, T8 e T9 as quantidades de nematoides por grama de raiz são menores em relação à T1, T2 e T3, porém sem diferença estatística entre si e as testemunhas.

Figura 8 – Raízes de tomateiro cv. Santa Cruz tratadas com isolados de bactérias e inoculadas com 1.000 J₂ de *Meloidogyne incognita*



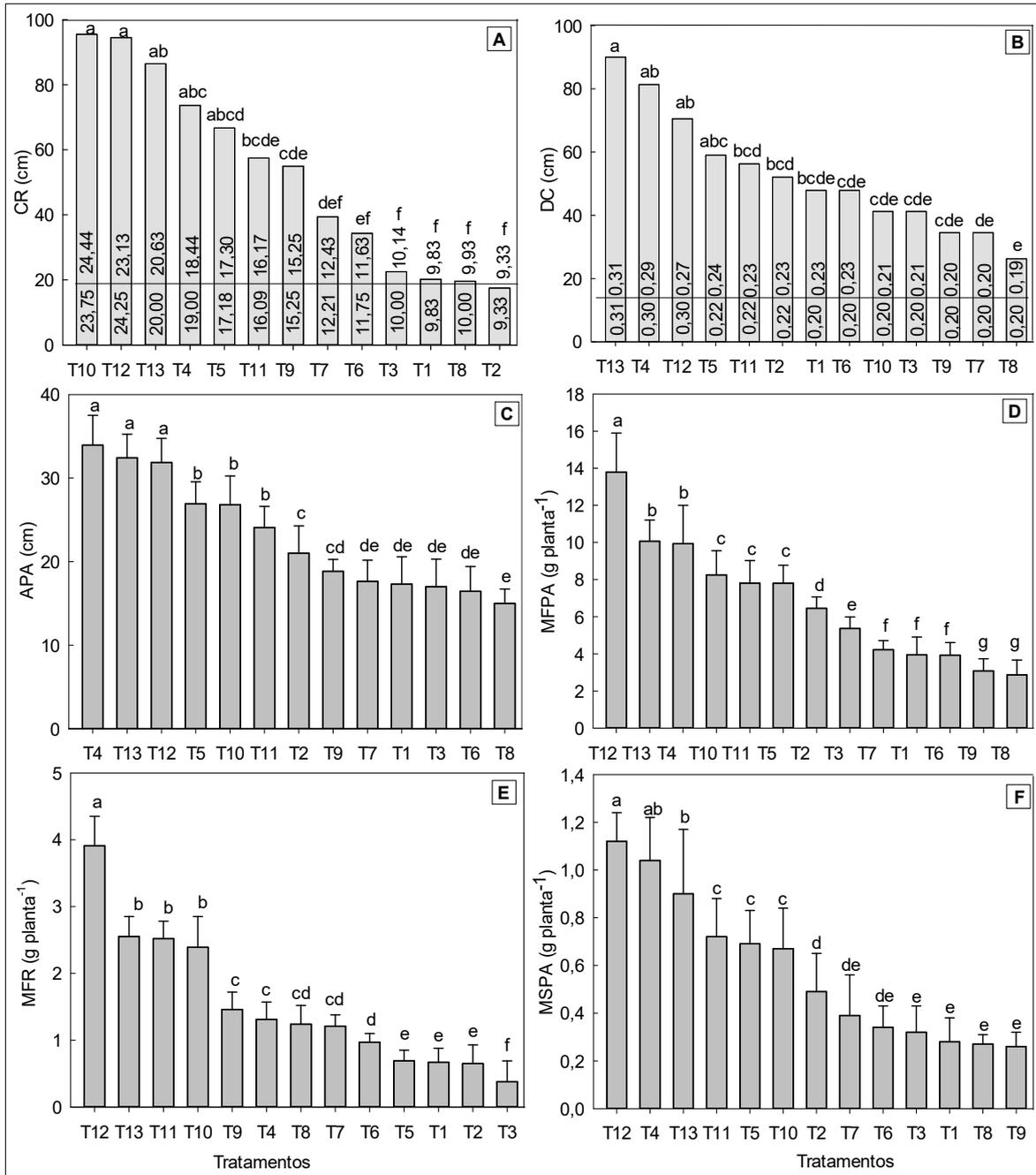
Avaliação realizada aos 60 dias após a inoculação. T1 (água), T2 (NB-5%), T3 (NB-15%), T4 (311a-5%), T5 (287a-5%), T6 (321b-5%), T7 (MA07-5%), T8 (195b-5%), T9 (311a-15%), T10 (287a-15%), T11 (321b-15%), T12 (MA07-15%) e T13 (195b-15%).

O comprimento da raiz (CR) do tomateiro cv. Santa Cruz foi variável entre os tratamentos, sendo T10, T12, T13, T4 e T5 com CR iguais a $(24,75 \pm 4,07)$, $(23,13 \pm 2,51)$, $(20,63 \pm 1,58)$, $(18,44 \pm 1,29)$ e $(17,30 \pm 0,88)$ ($p > 0,05$), respectivamente, com ($p < 0,05$) quando comparados com as testemunhas T1, T2 e T3 (Figura 9A).

A variável diâmetro do caule foi variável na maioria dos tratamentos com bactérias. A maior variação obtida foi com os tratamentos T13, T4 e T12, iguais estatisticamente, no entanto, diferentes em relação às testemunhas T1, T2 e T3 de acordo com teste de Kruskal-Wallis (Figura 9B).

A altura da parte aérea das plantas de tomateiro foi maior quando aplicado os tratamentos T4, T13 e T12 com médias iguais a $33,94 \pm 3,57$, $32,44 \pm 2,81$ e $31,86 \pm 2,90$, respectivamente, ($p > 0,05$), mas com diferença estatística entre os demais tratamentos, inclusive com plantas maiores em referência às testemunhas (Figura 9C).

Figura 9 – Caracteres agrônômicos de tomateiro cv. Santa Cruz realizada aos 60 dias após a inoculação de 1.000 J₂ de *M. incognita* e inoculação de suspensões de bactérias



A= comprimento de raiz (CR); B= altura da parte área (APA); C= diâmetro do caule em centímetros; D= massa fresca da parte área (MFPA); E= massa fresca da raiz (MFR) e MSPA= massa seca da parte área (MSPA) em gramas por planta de tomateiro cv. Santa Cruz. T1 (água), T2 (NB-5%), T3 (NB-15%), T4 (311a-5%), T5 (287a-5%), T6 (321b-5%), T7 (MA07-5%), T8 (195b-5%), T9 (311a-15%), T10 (287a-15%), T11 (321b-15%), T12 (MA07-15%) e T13 (195b-15%). valores abaixo e acima da linha horizontal em (CR e DC) são as medianas e médias, respectivamente. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelos testes de Kruskal-Wallis (CR e DC) e Duncan (APA, MFPA, MFR e MSPA) ($p > 0,05$).

Em relação a massa fresca da parte aérea das plantas a maior média foi com a aplicação do tratamento T12 ($13,79 \pm 2,10$) ($p < 0,05$). As outras duas maiores médias foram resultado da aplicação dos tratamentos T13 ($10,06 \pm 1,14$) e T4 ($9,93 \pm 2,07$), iguais estatisticamente, mas diferentes quando comparadas com as testemunhas sem aplicação de bactérias (Figura 9D).

O maior valor de massa fresca da raiz (MFR) foi com aplicação de T12 ($3,91 \pm 0,44$) ($p < 0,05$). Já os tratamentos T13, T11 e T10 possibilitaram às plantas massas frescas de raiz com médias iguais estatisticamente, mas com diferença quanto às testemunhas (T1, T2 e T3) (Figura 9E).

Os efeitos da aplicação dos tratamentos, na variável massa seca da parte aérea (MSPA), foram maiores com o T12 ($1,12 \pm 0,12$), porém não diferiu estatisticamente de T4 ($1,04 \pm 0,18$), sendo o T13 ($0,9 \pm 0,27$) o terceiro com plantas de maior massa seca, entre os demais tratamentos, com diferença estatística observada (Figura 9F).

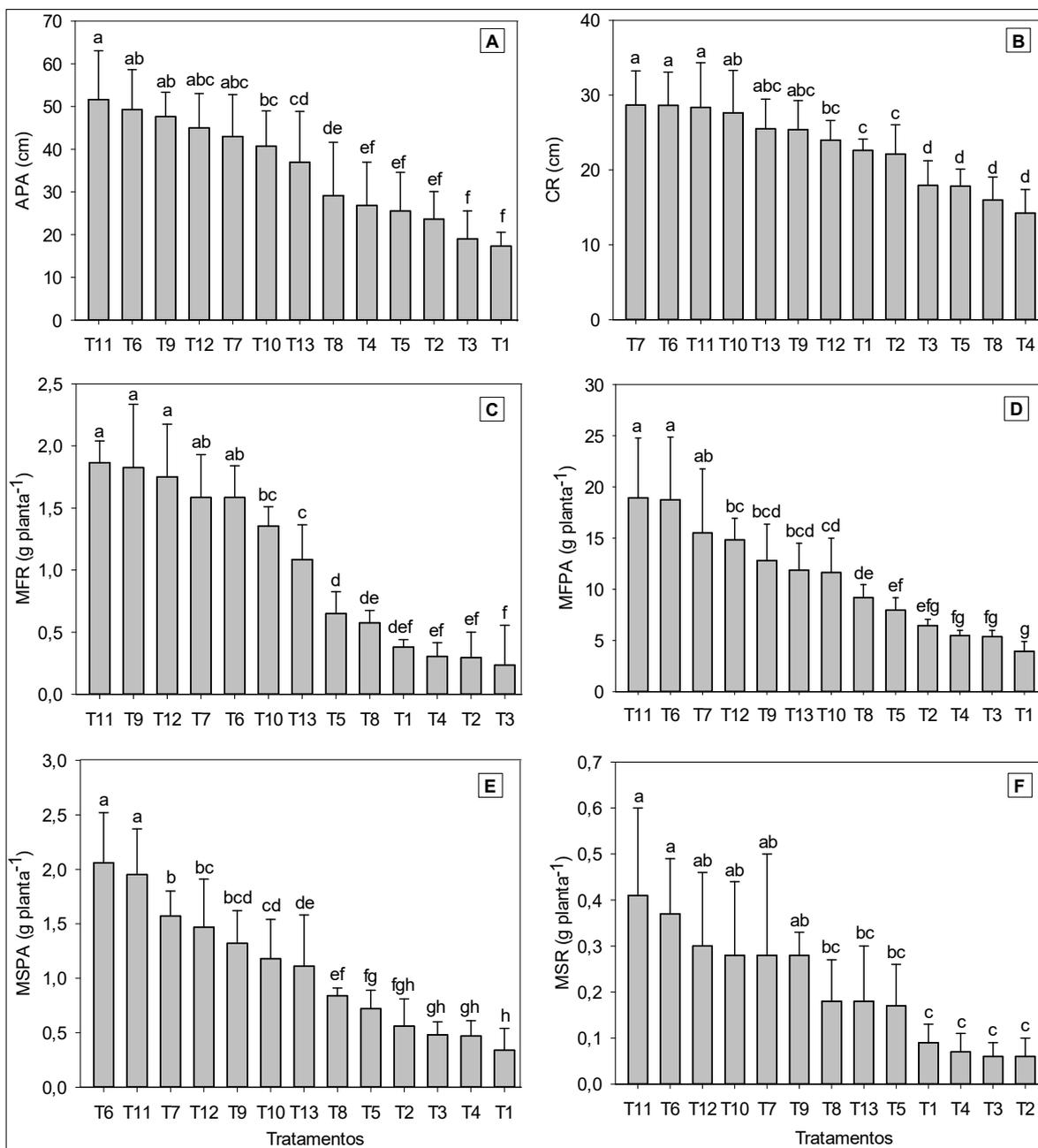
4.4.2 Promoção de crescimento

O maior crescimento da parte aérea (APA) de tomateiro cv. Santa Cruz foi obtido com o tratamento T11 ($51,63 \pm 11,42$), seguido dos tratamentos T6 ($49,25 \pm 9,39$), T9 ($47,63 \pm 5,7$), T12 ($45,00 \pm 8,03$) e T7 ($43 \pm 9,79$) ($p > 0,05$) com ($p < 0,05$), no que diz respeito à (T1, T2 e T3) (Figura 10A).

As plantas de tomateiro resultaram com maior crescimento de raiz (CR) quando foi aplicado o tratamento T7 ($28,66 \pm 4,58$), acompanhado dos tratamentos T6 ($28,63 \pm 4,44$), T11 ($28,38 \pm 5,95$), T10 ($27,63 \pm 5,68$), T13 ($25,50 \pm 3,96$) e T9 ($25,38 \pm 3,89$), ($p > 0,05$) (Figura 10B).

Os efeitos sobre a massa fresca de raiz (MFR) foram maiores com os tratamentos T11, T9, T12, T7 e T6 ($p > 0,05$). Com relação às plantas sem aplicação de bactérias os efeitos foram notados a partir da menor massa observada em T1, T2 e T3 ($p > 0,05$).

Figura 10 – Caracteres agrônômicos de tomateiro cv. Santa Cruz, realizada aos 60 dias após a inoculação de suspensões de bactérias



A= altura da parte aérea (APA); B= comprimento de raiz (CR); C= diâmetro do caule em centímetros; D= massa fresca da parte aérea (MFPA); E= massa fresca da raiz (MFR) e MSPA= massa seca da parte aérea (MSPA) em gramas por planta de tomateiro cv. Santa Cruz. T1 (água), T2 (NB-5%), T3 (NB-15%), T4 (311a-5%), T5 (287a-5%), T6 (321b-5%), T7 (MA07-5%), T8 (195b-5%), T9 (311a-15%), T10 (287a-15%), T11 (321b-15%), T12 (MA07-15%) e T13 (195b-15%). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ($p > 0,05$).

A massa fresca da parte aérea (MFPA) das plantas de tomateiro foi influenciada pela inoculação de bactérias dos tratamentos T11, T6 e T7 ($p < 0,05$) em detrimento de outros tratamentos, inclusive T1, T2 e T3 que não receberam inoculação (Figura 10D).

As variáveis massa seca da parte aérea (MSPA) (Figura 10E) e massa seca da raiz (MSR) (Figura 10F) seguiram com um comportamento semelhante às variáveis (MFPA e MFR), respectivamente, mas com alterações em relação às posições dos tratamentos com maiores e menores médias.

Figura 11: Raízes de tomateiro cv. Santa Cruz tratadas com isolados de bactérias, para avaliação de promoção de crescimento vegetal



Avaliação realizada aos 60 dias após a inoculação das bactérias. T1 (água), T2 (NB-5%), T3 (NB-15%), T4 (311a-5%), T5 (287a-5%), T6 (321b-5%), T7 (MA07-5%), T8 (195b-5%), T9 (311a-15%), T10 (287a-15%), T11 (321b-15%), T12 (MA07-15%) e T13 (195b-15%).

5 DISCUSSÃO

O controle biológico dos nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) está crescendo rapidamente no Brasil. As bactérias, especialmente as do gênero *Bacillus* estão sendo utilizadas comercialmente no manejo integrado sustentável de nematoides, por exemplo, os produtos Quartzo® e Presence® compostos por *B. subtilis* FMCH002 (DSM32155) + *B. licheniformis* FMCH001 (DSM32154) (AGROFIT, 2022) estão no mercado brasileiro. No entanto, sabe-se que muitas bactérias não são facilmente cultivadas aerobiamente, por exemplo, a espécie *Pasteuria penetrans* (WATRIN; SEKORA, 2014).

As pesquisas para seleção de isolados bacterianos promissores no biocontrole de nematoides estão sendo realizadas com uma variedade de culturas agrícolas, como a soja (ZHOU et al., 2021), algodão (PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL et al., 2021), arroz (PADGHAM; SIKORA, 2007) até hortaliças como tomate (CHOI et al., 2020) e pepino (PANPATTE et al., 2020).

O valor econômico da cultura agrícola utilizada é importante, sendo mais ainda as etapas de isolamento e seleção de agentes de biocontrole, pois são essenciais para obtenção de cepas eficientes para o desenvolvimento de bioprodutos (COTES et al., 2019; KÖHL et al., 2011; KÖHL et al., 2019). Neste estudo foram selecionados cinco isolados bacterianos por meio de quatro triagens, pela última foi possível correlacionar a supressão da população de *Meloidogyne incognita* pelos isolados que foram inoculados em tomateiro suscetível ao nematoide (cv. Santa Cruz), mas com a necessidade de estudos mais aprofundados para comprovação dos resultados.

5.1 Etapa I – “Screening” *in vitro*

A primeira etapa com 101 isolados candidatos resultou com uma pequena quantidade de bactérias selecionadas, ou seja, apenas 4% de toda a diversidade de bactérias testadas causaram mortalidade entre 71 a 80% da população de J₂ do nematoide (Figura 2). Outros trabalhos que avaliaram uma grande quantidade de isolados também verificaram que poucos podem atuar como antagonistas de nematoides, por exemplo, Zhao et al. (2021) isolou 448 cepas de bactérias endofíticas e duas (*Pseudomonas protegens* Sneb1997 e *Serratia plymuthica* Sneb2001) tiveram

resultados satisfatórios no biocontrole de *M. incognita*, de forma semelhante ocorreu com Xiang et al. (2017) quando testou 662 cepas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal contra J₂ de *M. incognita*, onde foi possível selecionar 72 cepas para testes em casa de vegetação com base numa triagem *in vitro*. Essa pequena quantidade de isolados foi claramente exposta por (KÖHL et al., 2011; KÖHL et al., 2019), onde os autores enfatizam que seleção de microrganismos parte de uma grande quantidade de isolados candidatos e, posteriormente com reduções no decorrer de várias etapas. Neste estudo a sugestão de KÖHL et al. (2011) em expor o estágio mais suscetível (J₂) do agente causal da doença (*M. incognita*) aos isolados candidatos foi seguida em todas as etapas.

5.2 Etapa II – Mortalidade de *Meloidogyne incognita* x tempo

A partir da etapa anterior foram selecionados nove isolados, mas apenas cinco resultaram mortalidade satisfatória. Sendo que a variável resposta proporção de mortalidade de J₂ de *M. incognita* foi melhor entendida por meio de análises estatísticas utilizando um modelo quase-binomial, pois os dados tinham uma superdispersão (DEMÉTRIO; HINDE; MORAL, 2014), necessitando de ajustes estatísticos para obtenção de comparações não subestimadas ou sobrestimadas.

A variável resposta proporção de mortalidade de J₂ expressa em percentual foi variável nos três tempos avaliados para cada isolado (Figura 4). A mortalidade de J₂ aumentou para todos os isolados a cada 24 horas, sendo o tempo de 72 h aquele com maior percentual de nematoides mortos. Isso pode estar relacionado com a produção de substâncias tóxicas, como os metabólitos secundários, já demonstrado em outros estudos, as bactérias podem produzir compostos e esses causar a mortalidade de J₂ (PADGHAM; SIKORA, 2007), essa relação foi relatada por Huang et al. (2010) quando avaliaram a mortalidade de J₂ e relacionaram com voláteis nematicidas como benzenoacetaldéido, 2-nonanona, decanal, 2-undecanona e dissulfeto de dimetila, produzidos por *B. megaterium* YMF.

Entre os isolados foram observadas diferenças estatísticas, onde cada um para cada tempo determinado houve aumento na mortalidade de J₂ (Figura 4E), mas essas diferenças foram mais significativas a partir de 48 h de exposição à suspensão bacteriana. Esses isolados podem ser considerados bons candidatos, pois a concentração de 10% utilizada neste estudo pode ser considerada baixa quando

comparada com outros trabalhos que utilizaram concentrações maiores (PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL et al., 2021; XIANG et al., 2017; ENGELBRECHT et al., 2020), esses autores utilizaram concentrações de (16 e 20%), 90 e 100%, respectivamente.

5.3 Etapa III – Concentrações x mortalidade de *Meloidogyne incognita*

Nesta etapa foi possível determinar as concentrações letais por meio de testes *in vitro*, estimadas em CL₅₀ e CL₇₀ (Tabela 1; Figura 6). As análises para encontrar essas concentrações foram semelhantes aquelas utilizadas na etapa II, a diferença foi a utilização da ligação logit, pois os tratamentos foram quantitativos. A explicação para o uso dos métodos estatísticos foi a superdispersão dos dados (DEMÉTRIO; HINDE; MORAL, 2014).

A maior mortalidade foi de 90%, com o isolado MA07, os demais isolados ficaram próximos desse percentual, por isso a CL₇₀ foi escolhida como a concentração mais alta para todos os isolados e, conseqüentemente a mais segura estatisticamente. Essa mortalidade pode ser considerada alta pelo tempo de exposição dos J_{2s}, levando em consideração a maior e menor CL₇₀ (15,97 e 9,25) (Tabela 1) da suspensão bacteriana, que em outros estudos pelo mesmo período e concentrações de 10–20% o percentual de mortalidade não passou de 60% pela cepa Y1 de *Bacillus amyloliquefaciens* (JAMAL et al., 2017).

Os juvenis de segundo estágio de nematoides são suscetíveis à ação enzimática de *B. firmus*, antibióticos tóxicos de *B. cereus* e *B. subtilis* e partículas de proteínas tóxicas, nomeadamente proteínas cry de *B. thuringiensis* (ABD- ELGAWAD; ASKARY, 2018).

Nestas condições experimentais os isolados candidatos apresentaram atividade antagônica contra J₂ de *M. incognita*, causando alta mortalidade quando os juvenis foram expostos a baixas concentrações bacterianas. Xiang et al. (2017) e Engelbrecht et al. (2020) observaram mortalidade J₂ de *M. incognita* por isolados identificados como de *B. soli*, *B. altitudinis*, *B. aryabhattai* e *B. safensis* quando expostos a altas concentrações bacterianas.

5.4 Etapa IV – Controle de *Meloidogyne incognita* x promoção de crescimento

O controle biológico ou o manejo biológico de nematoides por meio de agentes biológicos pode ser dividido em: antagonismo e fatores de promoção do crescimento das plantas (STIRLING, 2014). Diferentes gêneros de bactérias podem estar envolvidos como antagonistas e promotores de crescimento vegetal: *Pasteuria*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Achromobacter* e *Rhizobium* (FORGHANI; HAJIHASSANI, 2021).

Os juvenis de segundo estágio de *M. incognita* podem ser repelidos das raízes das plantas por meio do consumo ou colonização dos exsudatos radiculares pelas bactérias, reduzindo os danos pelo parasitismo do nematoide. Essa situação foi comprovada com a aplicação de *B. cereus* cepa BCM2 em tomateiro (LI et al., 2019).

Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos como regulação positiva de vários genes endógenos de defesa, como genes relacionados à patogênese dependente de ácido salicílico (SA) da resistência sistêmica adquirida (SAR) (MOLINARI; LEONETTI, 2019).

Neste estudo foi observado redução da densidade populacional de *M. incognita* (Figura 7) em relação às plantas que não receberam a suspensão bacteriana, a redução foi mais de 70% com uma concentração de 15% do isolado 287a. Cepas específicas de *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. mycoides* e *B. spericus* agem como elicitores causando redução na severidade e no aumento populacional de nematoides-das-galhas (KOKALIS-BURELLE; KLOEPPER; REDDY, 2006; ZHANG, 1996).

As plantas inoculadas com suspensões bacterianas na maioria dos tratamentos neste estudo responderam com um comprimento de raiz maior que as plantas não inoculadas (Figura 9A). As raízes são importantes na absorção de nutrientes do solo e, quando se encontram com uma alta população de nematoides ficam menos eficientes (JAMAL et al., 2017).

Efeitos na altura das plantas inoculadas com suspensões bacterianas foram observados (Figuras 9C, 10A), por outro lado, as plantas sem a inoculação de bactérias cresceram menos. Assim, é possível afirmar que as reduções no comprimento de raiz, diâmetro, massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca da raiz estão fortemente correlacionados com a doença causada pelo nematoide (Figura 9A, B, D, F). Os efeitos nestas variáveis foram maiores no experimento sem a

presença do nematoide (Figura 10). Os motivos que as plantas respondem à inoculação de bactérias já estão bem evidenciados, principalmente pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato mineral, produção de hormônios vegetais e produção de sideróforos (LIU et al., 2016; PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL et al., 2021). No entanto, neste estudo análises como essas ainda necessitam ser realizadas.

Outras características das bactérias são auxiliar as plantas por meio de mecanismos como a facilitação direta da aquisição de recursos e produção de citocininas e giberelinas, e indiretamente pela produção de antibióticos e enzimas líticas (GLICK, 2012).

O fato das plantas inoculadas com suspensões bacterianas terem maior massa fresca e seca de parte aérea e de raiz e, conseqüentemente maior comprimento de raiz (Figura 10D, B, F) pode estar relacionado com a produção de substâncias bioativas na rizosfera, as quais, podem promover o crescimento das plantas e proteger contra patógenos (Figura 10) como evidenciado por (ZHOU et al., 2016).

A aplicação de agentes de controle biológico e a promoção do crescimento da planta não é um conceito novo (OOSTENDORP et al., 1991) e já foi discutido em várias revisões abrangentes (CROSS et al., 1999; SCHOUTEDEN et al., 2015; GLICK, 2012; DUTTA et al., 2019). Por isso, os resultados deste estudo indicam fortemente a produção de compostos bioativos pelos isolados candidatos, que por sua vez agiram na supressão da reprodução de *M. incognita* e também na promoção do crescimento vegetal do tomateiro cv. Santa cruz no experimento sem nematoides.

6 CONCLUSÕES

Os nematoides de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* quando são expostos às suspensões bacterianas dos isolados 311a, 321b, MA07, 287a e 195b morrem. Isso demonstra que existe a possibilidade de ação de substâncias, externamente ou internamente no corpo dos nematoides.

Os isolados 311a, 321b, MA07, 287a e 195b, são promissores candidatos, para controle de *Meloidogyne incognita* e promoção de crescimento vegetal.

O isolado 287a, com uma concentração de 15% da suspensão bacteriana, resulta com mais de 80% de controle do nematoide, nestas condições experimentais. Uma segunda etapa de testes bioquímicos, termoestabilidade de metabólitos e testes em condições de campo em culturas alvos e condições de solo, necessitam ser realizadas para confirmação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY, E.; PRODAN, S.; ZAMORANO, A. *et al.* Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 131, 2017.
- ABBASI, M. W.; AHMED, N.; ZAKI, M. J. *et al.* Potential of *Bacillus* species against *Meloidogyne javanica* parasitizing eggplant (*Solanum melongena* L.) and induced biochemical changes. **Plant and Soil**, v. 375, n. 1, p. 159–173, 2014.
- ABD-ELGAWAD, M. M. M.; ASKARY, T. H. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 74, 2018.
- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- BAKER K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. WH Freeman & Co., San Francisco. 1974.
- BELL, C. A.; LILLEY, C. J.; MCCARTHY, J. *et al.* Plant-parasitic nematodes respond to root exudate signals with host-specific gene expression patterns. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 2, p. e1007503, 2019.
- BEZERRA, T. N.; EISENDLE, U.; HODDA, M. *et al.* Nemys: World Database of Nematodes. *Meloidogyne* Goeldi, 1892. Disponível em: <<https://nemys.ugent.be/aphia.php?p=taxdetails&id=1294055>> Acesso em: 12 dez. 2021.
- BISHOP, A. H.; GOWEN, S. R.; PEMBROKE, B. *et al.* Morphological and molecular characteristics of a new species of *Pasteuria* parasitic on *Meloidogyne ardenensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 28–33, 2007.
- BONETI, J.I.S & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6: 553, 1981.
- BURKETT-CADENA, M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAWRENCE, K. S. *et al.* Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 55–59, 2008.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. IN: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO e SILVA, L. H. (Eds). **Diagnose de fitonematoides**. Vol. 1. Campinas, SP, Millennium Editora, p. 47–70, 2016.

CASTANEDA-ALVAREZ, C.; ABALLAY, E. Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 203, 2016.

CASTILLO, J. D.; LAWRENCE, K. S.; KLOEPPER, J. W. Biocontrol of the reniform nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on Cotton. **Plant Disease**, v. 97, n. 7, p. 967–976, 2013.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52:7–76, 2002.

CHARLES, L.; CARBONE, I.; DAVIES, K. G. *et al.* Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. **Journal of Bacteriology**, 2005.

CHEN, J.; WU, Q.; HUA, Yi. *et al.* Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 23, p. 8309–8319, 2017.

CHOI, T. G.; MAUNG, C. E. H.; LEE, D. R.; *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.

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

COTES, A. M.; KÖHN, X. F. J. Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores (COTES, A. M (Ed.). **Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaro**, v. 2, AGROSAVIA, Mosquera, pp. 598–627, 2019.

CROSS, J. V.; SOLOMON, M. G.; CHANDLER, D.; *et al.* Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 125–149, 1999.

CULTIVAR, R. **Mercado de biológicos para a agricultura já movimentada quase R\$ 1 bilhão no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/mercado-de-biologicos-para-a-agricultura-ja-movimentada-quase-r-1-bilhao-no-brasil>. Acesso em: 12 abr. 2022.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. **Nematology Monographs & Perspectives - Proceedings of the Fourth International Congress of Nematology**, 8–13 June 2002, Tenerife, Spain. 2: 633–653, 2004.

DEMÉTRIO, C. G. B.; HINDE, J.; Moral, R. A. Models for overdispersed data in entomology. *In*: Ferreira C., Godoy W. (eds). *Ecological Modelling Applied to Entomology*. Entomology in Focus, vol 1. **Springer**, Cham, 2014.

DERTZ, 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.

DUTTA, T. K.; KHAN, M. R.; PHANI, V. Plant-parasitic nematode management via biofumigation using brassica and non-brassica plants: Current status and future prospects. **Current Plant Biology**, v. 17, p. 17–32, 2019.

E, G.-A.; AA, B.-B.; AL, K.-M.; *et al.* Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological research**, v. 219, 2019.

ELBANNA, K.; GAMAL-ELDIN, H.; ABUZAED, E. Characterization of egyptian fluorescent rhizosphere pseudomonad isolates with high nematicidal activity against the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 1, n. 1, 2011.

ENGELBRECHT, G.; HORAK, I.; JANSEN VAN RENSBURG, P. J. *et al.* *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 629–653, 2018.

ENGELBRECHT, G.; RENSBURG, P. J. Jan van.; FOURIE, H.; *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.

FISCHER, A. Untersuchungen über Bakterien. Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik, 27: 1–163, 1895.

FORGHANI, F.; HAJIHASSANI, A. Recent Advances in the development of environmentally benign treatments to control root-knot nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1125, 2020.

GAO, H.; QI, G.; YIN, R. *et al.* *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28756, 2016.

GARRITY, G. M.; BELL J. A.; LILBURN T. Ordem II. Acidithiobacillales ord. nov. *In*: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a ed., Vol. 2 (The Proteobacteria), parte B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, p. 60, 2005.

GENG, C.; NIE, X.; TANG, Z.; *et al.* A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25012, 2016.

GIBBONS, N. E.; MURRAY, R. G. E. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 1978.

GIERTH, K. et al. Plant tolerance for managing plant parasitic nematodes. **IOBC WPRS BULLETIN**, v. 27, n. 1, p. 67-74, 2004.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. e963401, 2012.

GÖLDI, E. A. Relatoria sôbre a molestia do cafeiro na provincial da Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro** 8, 1–112, 1892.

HOSNY GAMAL, K. E. Characterization of egyptian fluorescent rhizosphere *Pseudomona* isolates with high nematicidal activity against the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 01, n. 01, 2010.

HUANG, Y.; XU, C.; MA, Li. 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.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds.) *Root-Knot Nematodes*. Cambridge: CABI International, 2009, p. 55–97.

HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F. M. W. Nematode parasitism of plants. In: PERRY R. N.; WRIGHT, D. J. (eds) **Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 213–243, 1998.

HUSSEY, S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* Species. In: **Plant resistance to parasitic nematodes**. J. L. STARR, R. COOK; J. BRIDG (edited by), 2002.

JAMAL, Q.; CHO, J.-Y.; MOON, J.-H.; et al. Identification for the first time of cyclo (d-Pro-I-Leu) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1839, 2017.

JAYAKUMAR, J. *Streptomyces avermitilis* as a biopesticide for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 22, n. 3, p. 564–566, 2009.

JONATHAN, E. I.; BARKER, K. R.; ABDEL-ALIM, F. F. et al. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria Penetrans*. **Nematropica**, p. 231–240, 2000.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. L.; MOENS, M. (Eds). **Plant nematology**. Cambridge: CABI North America Office, p. 59–90, 2013.

KÖHL, J.; DE GEIJN, H. G.-van.; HAAS, L. G. et al. Stepwise screening of candidate antagonists for biological control of *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **Biological Control**, v. 136, p. 104008, 2019.

- KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P. *et al.* Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v. 57, n. 1, p. 1–12, 2011.
- KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n. 1–2, p. 91–100, 2006.
- KORSHUNOVA, T. Yu.; BAKAEVA, M. D.; KUZINA, E. V. *et al.* Role of bacteria of the genus *Pseudomonas* in the sustainable development of agricultural systems and environmental protection (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 281–296, 2021.
- 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.
- LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Antagonistic potential of *Bacillus pumilus* L1 against root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 29–39, 2016.
- LI, J.; ZOU, C.; XU, J. *et al.* Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 67–95, 2015.
- LI, X.; HU, H.-J.; LI, J.-Y.; *et al.* Effects of the endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2 on tomato Root exudates and *Meloidogyne incognita* Infection. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1551–1558, 2019.
- LIU, G.; LIN, X.; XU, S. *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.; GARRETT, C.; FADAMIRO, H. *et al.* Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 99, p. 8–13, 2016.
- LOGAN, N. A.; VOS, P. D. *Bacillus*. *Bergey's manual of systematics of archaea and Bacteria*, p. 1 – 163, 2015.
- LOPES, E. A.; FERRAZ, S. Importância dos fitonematoides na agricultura. IN: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO e SILVA, L. H. (Eds). **Diagnose de fitonematoides**. Vol. 1. Campinas, SP, Millennium Editora, p. 1–10, 2016.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 264–268, 2013.
- MA, Li.; CAO, Y. H.; CHENG, M. H. *et al.* Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of panax notoginseng with antagonistic characteristics towards

pathogens of root-rot disease complex. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 299–312, 2013.

MACHADO, A. C. Z., KANEKO, L. PINTO, Z. V. Controle biológico. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (eds). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. IMAmt, pp. 287–312, 2016.

MACHADO, A.C.Z. Controle químico. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (eds). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. IMAmt, pp. 313–339, 2016.

MARHAVÝ, P.; KURENDA, A.; SIDDIQUE, S. *et al.* Single-cell damage elicits regional, nematode-restricting ethylene responses in roots. **The EMBO journal**, v. 38, n. 10, p. e100972, 2019.

MAZZUCHELLI, R. de C. L.; MAZZUCHELLI, E. H. L.; ARAUJO, F. F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**, v. 143, p. 104185, 2020.

MCCARTER, J. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematode. In: BERG, R.; TAYLOR, C. (Eds). **Cell Biology of plant nematode parasitism**. v. 15. Berlin/Heidelberg: Springer, p. 239-267, 2009.

McCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized Linear Models; Chapman and Hall: London, UK, 511 p., 1989.

MIGULA, W. Über ein neues System der Bakterien. Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe 1, 235-238 1894.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. **Meloidogyne species – a diverse group of novel and important plant parasites**. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed). Rootknot nematodes. Wallingford, UK, CAB International, p. 1- 17, 2009.

MOGHADDAM, R M.; MAHDIKHANI MOGHADDAM, E.; BAGHAEE RAVARI, S.; *et al.* The nematicidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 279–290, 2014.

MOHAMED, Z. K.; EL-SAYED, S. A.; RADWAN, T. *et al.* Potency evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agents for root-knot nematodes in Egypt. **undefined**, 2009.

MOLINARI, S.; LEONETTI, P. Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. **PloS One**, v. 14, n. 12, p. e0213230, 2019.

MONNIER, N.; FURLAN, A.; BOTCAZON, C. *et al.* Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. **Frontiers in Plant Science**, v. 0, 2018.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **J. Stat. Softw**, 81, 23, 2017.

MORGADO, T. D. T.; GUERRA, J. D.; ARAUJO, F. F. de. *et al.* Effectiveness and persistence of biological control of nematodes in sugarcane. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 49, p. 4490–4495, 2015.

MORRISSEY, J. P.; ABBAS, A.; MARK, L.; CULLINANE, M.; O'GARA, F. Biosynthesis of antifungal metabolites by biocontrol strains of *Pseudomonas*. **The Pseudomonads**, Vol. III (RAMOS, J. L, ed), pp. 635–670, 2004.

MUÑOZ TORRES, P.; CÁRDENAS, S.; ARISMENDI MACUER, M. *et al.* The Endophytic *Pseudomonas* sp. S57 for plant-growth promotion and the biocontrol of phytopathogenic fungi and nematodes. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1531, 2021.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population Development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v. 23, n. 1, p. 58–64, 1991.

ORLA-JENSEN, S. The main lines of the natural bacterial system. **Journal of bacteriology**, v. 6, n. 3, p. 263-273, 1921.

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum and *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 164, p. 104764, 2021.

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.

PANPATTE, D. G.; SHELAT, H. N.; JHALA, Y. K.; *et al.* Fortified bacterial consortium – A novel approach to control root knot nematode in cucumber (*Cucumis sativum*). **Biological Control**, v. 155, p. 104528, 2021.

PIGNATELLI, M. A.; MOYA, J. T. A database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa *Environ. Microbiol.* pp. 191-197, 2009.

PINHEIRO, J. B. Nematoides em hortaliças. Embrapa Hortaliças–Livro técnico (INFOTECA-E). 2017.

PRÉVOT, A. R. B. Em: HAUDUROY, P.; EHRINGER, G.; GUILLOT, G.; MAGROU, J.; PRÉVOT, A. R.; ROSSET, U. A (eds). **Dictionnaire des bacteries pathogenes**. 2^a ed., Masson, Paris, p. 692, 1953.

R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1523–1538, 2011.

SARAF, M.; PANDYA, U.; THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 18–29, 2014.

SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. A word perspective on nematology: The role of the Society. In: VEECH, J.A; DICKSON, D.W. (Eds.). **Vistas os nematology: a Commemoration of the Twenty-fith anniversary of the Society of nematologist**. Hyattsville: Society of Nematologist, p.7–14, 1987.

SAYRE, R. M.; STARR, M. P. *Pasteuria penetrans* a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington (USA)**, 1985.

SCHOUTEDEN, N.; DE WAELE, D.; PANIS, B. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: A review of the mechanisms involved. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1280, 2015.

SIDDIQUE, S., GRUNDLER, F.M.W. **Chapter Five—Metabolism in Nematode Feeding Sites**. In C. Escobar., C. Fenoll (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 73, pp. 119–138). Academic Press. 2015

SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F. M. W. Chapter Five - Metabolism in Nematode Feeding Sites. *In: ESCOBAR, C.; FENOLL, C. (Orgs.). Advances in Botanical Research*. [s.l.]: Academic Press, v. 73, p. 119–138, 2015.

SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F. M. W. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 102–108, 2018.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Systemic resistance in tomato Induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is Independent of salicylic acid production. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 1, p. 48–54, 2004.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S.; SHEIKH, I. H. *et al.* Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 641–650, 2006.

SIDDIQUI, I. A; SHAHID SHAUKAT, S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 1615–1623, 2003.

SIDDIQUI, I. Ali.; HAAS, D.; HEEB, S. Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5646–5649, 2005.

SON, S. H.; KHAN, Z.; KIM, S. G. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex

caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 524–532, 2009.

SOUTHEY, J. F. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 5th Ed. London, U. K. **Ministry of Agriculture Fisheries and Food**, 1970.

STIRLING, G. R. Biological control of plant-parasitic nematodes. 2nd ed (Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International) 2014.

SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M. Molecular Systematics. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (eds). CAB International 2013. Plant Nematology, 2nd, 40–60 pp.

SUN, X.; ZHANG, R.; DING, M. *et al.* Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by a nematicidal bacterium *Pseudomonas simiae* MB751 with cyclic dipeptide. **Pest Management Science**, v. 77, n. 10, p. 4365–4374, 2021.

TAYLOR, D. P.; SASSER, J. N. **Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: Universidad del Estado de Carolina del Norte, 111 p. 1983.

TYC, O.; SONG, C.; DICKSCHAT, J. S. *et al.* The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 280–292, 2017.

USTA, Canan. Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). [s.l.]: IntechOpen, 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/44118>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

W, R.; N, L.; D, L. *et al.* Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. **Microbiological research**, v. 192, 2016.

WANG, S.; FAN, H.; ZHAO, Di. *et al.* Multifunctional efficacy of the nodule endophyte *Pseudomonas fragi* in stimulating tomato immune response against *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 164, p. 104773, 2021.

WATRIN, C.; SEKORA, N. Pasteuria species as a bio-control agent for control of plant-parasitic nematodes. In: **JOURNAL OF NEMATOLOGY**. PO BOX 311, MARCELINE, MO 64658 USA: SOC NEMATOLOGISTS, p. 254-255, 2014.

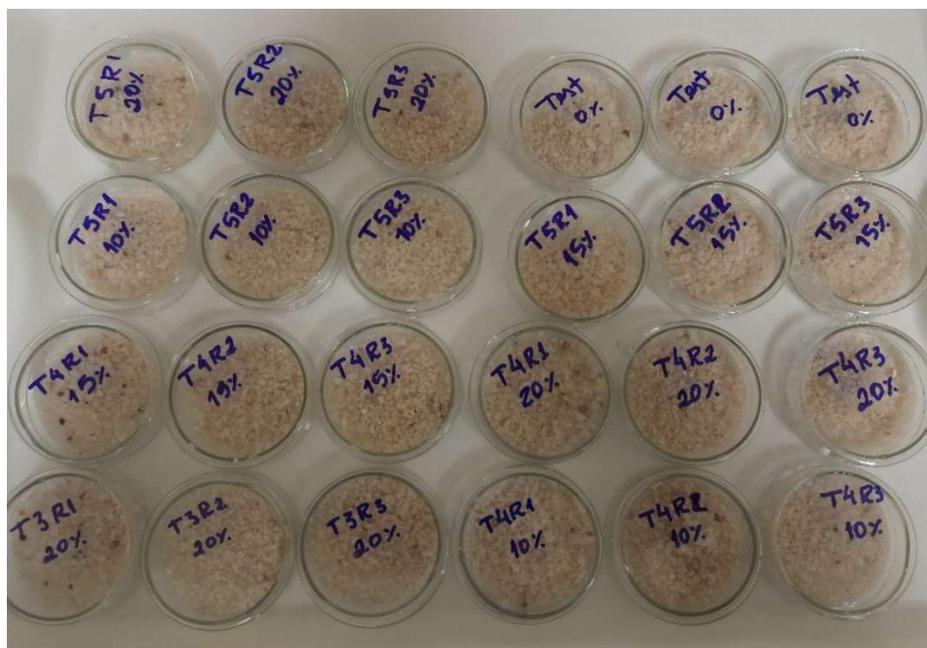
WHITEHEAD, A. G.; HERMMING, J. R. A comparison of some quantitative methods of extraction small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, v. 55, 25-28, 1965.

WINSLOW, C. E.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R. E.; KRUMWIEDE J. r, C.; ROGERS, L. A.; SMITH, G. H. The families and genera of the bacteria preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. **Journal of bacteriology**, v. 2, n. 5, p. 505-566, 1917.

- XIA, Y.; XIE, S.; MA, X. *et al.* The purl gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS microbiology letters**, v. 322, n. 2, p. 99–107, 2011.
- XIANG, N.; LAWRENCE, K. S. Optimization of *in vitro* techniques for distinguishing between live and dead second stage juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154818, 2016.
- 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.
- XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; KLOEPPER, J. W. *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.
- ZHAI, Y.; SHAO, Z.; CAI, M. *et al.* Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1^a00316 from antarctic soil 60against *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 253, 2018.
- 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, J.; WANG, S.; ZHU, X. *et al.* Isolation and characterization of nodules endophytic bacteria *Pseudomonas protegens* Sneb1997 and *Serratia plymuthica* Sneb2001 for the biological control of root-knot nematode. **Applied Soil Ecology**, v. 164, p. 103924, 2021.
- ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y. *et al.* Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v. 84, p. 8–13, 2016.
- ZHOU, Y.; CHEN, J.; ZHU, X. *et al.* Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in soybean. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 568–576, 2021.

APÊNDICE A – Exemplo do “Screening” *in vitro* em areia sílica

Figura 12 – Exemplo experimental de areia em placa de Petri, para inoculação de J₂ de *Meloidogyne incognita*



Fonte: Autor

APÊNDICE B – Exemplo dos experimentos *in vivo*

Figura 13 – Exemplo do “screening” *in vivo*, em casa de vegetação



Fonte: Autor